

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1935-1936

N° 3

Des Qualités Bactériologiques de Diverses Peptones

I. — Etude numérique du croît bactérien
et du rythme de la multiplication

II. — Contribution à l'étude
du métabolisme azoté du bacille pyocyanique

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

présentée et soutenue le *Novembre 1935*

PAR

Jacques MORCHOISNE

Pharmacien

Ex-Interne des Hôpitaux de Paris

Ancien Moniteur à la Faculté de Pharmacie

JURY { MM. RADAIS, Président.
 HÉRISSEY, Professeur.
 J. RÉGNIER, Agrégé.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1935



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DES QUALITÉS BACTÉRIOLOGIQUES
DE DIVERSES PEPTONES

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1935-1936

N° 3

Des Qualités Bactériologiques de Diverses Peptones

I. — Etude numérique du croît bactérien
et du rythme de la multiplication

II. — Contribution à l'étude
du métabolisme azoté du bacille pyocyanique

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

présentée et soutenue le Novembre 1935

PAR

Jacques MORCHOISNE

Pharmacien

Ex-Interne des Hôpitaux de Paris

Ancien Moniteur à la Faculté de Pharmacie

JURY } MM. RADAIS, Président.
 } HÉRISSEY, Professeur.
 } J. RÉGNIER, Agrégé.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1935

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUERIN, Doyen, O. $\star$, $\S$ I.
P. LEBEAU, Assesseur, O. $\star$, $\S$ I.
P. DESPORT, Secrétaire, $\star$, $\S$ I.

PROFESSEURS

MM. GUERIN, O. $\star$, $\S$ I. Botanique générale.
PERROT, C. $\star$, $\S$ I. Histoire naturelle des médicaments.
COUTIERE, O. $\star$, $\S$ I. Zoologie.
LEBEAU, O. $\star$, $\S$ I. Pharmacie chimique.
BOUGAULT, $\star$, $\S$ I. Chimie analytique.
GORIS, O. $\star$, $\S$ I. Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. $\star$, $\S$ I. Physique.
DAMIENS, $\star$, $\S$ I. Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. $\star$, $\S$ I. Chimie biologique.
SOMMELET, $\star$, $\S$ I. Chimie organique.
LUTZ, $\star$, $\S$ I. Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, $\star$, $\S$ I. Toxicologie.
LAUNOY, O. $\star$, $\S$ I. Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. $\star$, $\S$ I.

Professeurs honoraires : MM. DELEPINE, O. $\star$, $\S$ I. et GUERBET, $\star$, $\S$ I.
BEHAL, G. O. $\star$, $\S$ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. Marc HONNORAT, $\star$, $\S$ I. Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. $\star$, $\S$ I. Pharmacodynamie.
DELABY, $\star$, $\S$ I. Hydrologie et Hygiène.
PICON, $\S$ I. Minéralogie.
BACH, $\S$ I. Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, $\star$, $\S$ I.	MM. BACH, $\S$ I.
PICON, $\S$ I.	BEDEL, $\S$ I.
MASCRE, $\S$ I.	REGNIER, $\S$ I.
FLEURY, $\S$ I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, $\S$ I., agrégé, chargé des T. P. de 1^{re} année. Chimie générale.
FLEURY, $\S$ I. et REGNIER, $\S$ I. : agrégés,
chargés des travaux de Chimie analytique.
SOUÈGES, $\S$ I. Micrographie.
LEROUX, $\S$ I. Physique.
DEVAL, $\star$, $\S$ I. Microbiologie.
DELABY, $\star$, $\S$ I., PICON, $\S$ I. et MASCRE, $\S$ I. :
agrégés, chargés des travaux généraux de 4^e année.
Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, $\S$ I.



A LA MÉMOIRE DE MA SŒUR

A MA MÈRE

A MON PÈRE

A MA FEMME

A MON FILS

A MES PARENTS

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR RADAIS

Doyen Honoraire de la Faculté de Pharmacie de Paris
Membre de l'Académie de Médecine

Qui me fait l'honneur d'accepter la
présidence de cette thèse, en témoignage
de ma profonde reconnaissance et de
mon respectueux dévouement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR HERISSEY

Professeur de Chimie biologique à la Faculté de Pharmacie de Paris

En hommage de ma gratitude et de
mon profond respect.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ J. REGNIER
Pharmacien des Hôpitaux de Paris

A qui je dois le sujet de cette thèse
et le meilleur de ce travail, en reconnaissance de ma profonde gratitude.

A MONSIEUR R. DAVID
Pharmacien des Hôpitaux de Paris

Qui a bien voulu me guider dans ces
recherches, en remerciement de son aide
si efficace et si bienveillante.

INTRODUCTION

Deux préoccupations essentielles guident le bactériologiste dans le choix d'un milieu de culture. D'une part le milieu choisi doit être aussi simple que possible et posséder une composition suffisamment définie, d'autre part ce même milieu doit permettre une multiplication normale du germe envisagé. Ces deux conditions sont-elles facilement conciliables dans la pratique ?

Un bon milieu doit être facile à préparer et avoir une composition aussi constante et aussi simple que possible. Il importe en effet de pouvoir en obtenir facilement des quantités diverses, à des moments différents, et de disposer constamment d'un produit invariable dont la constitution sera facile à vérifier.

Les milieux naturels, habituellement utilisés, répondent difficilement à ces conditions. Le bouillon nutritif ordinaire, par exemple, verra sa composition, déjà si complexe, varier avec la nature de la viande utilisée, la durée et la température de la macération, l'action des germes extérieurs intervenant pendant la préparation, la température et la durée de la stérilisation, etc... Un même germe ensemencé en quantités égales, dans des bouillons nutritifs appartenant à des lots différents, ne donnera pas toujours, sous un temps donné, la même quantité de cellules filles ou ne secrétera pas toujours des toxines également actives. C'est pour remédier à ces inconvénients que, depuis quelques dizaines d'années et grâce aux progrès réalisés dans l'étude du métabolisme microbien, les bactériologistes ont été amenés à mettre au point les milieux dits « synthétiques », milieux préparés à partir de composés bien définis et soigneusement purifiés.

Ces milieux chimiquement définis, supérieurs aux milieux naturels au point de vue de la régularité de leur composition, permettent-ils un développement normal et abondant des germes ensemencés ? Nous devons constater que, sur ce point, les milieux « synthétiques » sont généralement très inférieurs aux milieux naturels. Sans doute ces milieux fournissent des récoltes généralement constantes, mais celles-ci sont bien loin d'être aussi importantes que celles que l'on obtient avec les milieux utilisés par les premiers bactériologistes. De plus si l'on suit, à intervalles réguliers, le développement microbien dans les milieux ensemencés pendant les premiers jours de la culture, on constate que le rythme de la multiplication est très ralenti quand on utilise les milieux chimiquement définis.

Un milieu synthétique parfait semble donc, à l'heure actuelle, fort difficile à réaliser. En effet, pour convenir parfaitement à la multiplication bactérienne, un milieu de culture doit présenter une composition fort complexe. Si dans l'élaboration d'un milieu chimiquement défini il paraît relativement facile d'introduire les éléments salins et les éléments sucrés nécessaires au métabolisme microbien, il n'en est plus de même lorsqu'il s'agit de l'apport de l'azote. Tandis que les milieux naturels, préconisés par les premiers bactériologistes, renferment non seulement des albumines, solubles dans certaines conditions de préparation, des albumoses et des peptones, mais encore toute une série d'acides aminés et des sels ammoniacaux, les milieux chimiquement définis ne contiennent généralement, du point de vue azoté, qu'un sel ammoniacal ou qu'un ou quelques acides aminés. Il n'est donc pas surprenant que la bactérie ne trouve pas dans ces milieux artificiels la qualité et la quantité d'aliment azoté qu'elle rencontre facilement dans les milieux naturels.

Des considérations du même ordre interviennent si nous envisageons le rôle joué par le soufre dans la molécule de certains acides aminés et l'influence exercée par les vitamines sur la croissance et la multiplication de tout ce qui est vivant.

Le travail que nous présentons ici est donc conçu dans un esprit un peu différent de celui qui animait et anime encore beaucoup de bactériologistes.

Nous croyons qu'il est, pour le moment, difficile de donner, à partir de corps purs, toutes les substances nécessaires à la vie normale de la bactérie; nous pensons même qu'il doit exister des proportions des divers éléments plus ou moins favorables à la bactérie, proportions fort difficiles à déterminer. Pour toutes ces raisons, sur les conseils de M. le Professeur agrégé J. RÉGNIER, et sous la direction technique de M. R. DAVID, pharmacien des Hôpitaux, nous avons été amenés à étudier des milieux de culture de composition autant que possible constante, plus favorables que les milieux synthétiques à la vie bactérienne.

Nous avons apporté une bonne partie des éléments nécessaires à la bactérie, C., Az., S., P., etc., en utilisant simplement des peptones purifiées de caractères suffisamment définis pour qu'il soit possible de retrouver dans le commerce ou de préparer au laboratoire des produits sensiblement identiques.

Pour étudier la multiplication microbienne dans ces milieux peptonés, nous ne nous sommes pas bornés à évaluer le trouble plus ou moins grand de la culture, ou même l'intensité plus ou moins forte de la pigmentation, mais nous avons procédé à de nombreuses numérations des germes, de sorte qu'il nous a été possible de connaître et le taux de la récolte et le rythme de la multiplication.

Le microbe que nous avons choisi est le bacille pyocyanique. Sa pigmentation apporte un certain nombre d'avantages. Son métabolisme est parmi les mieux étudiés.

Nous avons utilisé de nombreuses peptones, les unes d'origine commerciale, les autres étant préparées par nous au laboratoire. Après avoir analysé et différencié ces diverses substances, nous avons étudié la multiplication du bacille pyocyanique dans des solutions à 10 pour 1.000 de ces peptones. Les peptones, qui nous ont fourni les résultats les plus intéressants, ont été soumises à la dialyse et nous avons comparé la multiplication du même bacille dans des solutions obtenues

avec ces peptones normales ou avec les mêmes peptones dialysées. Enfin nous avons recherché l'influence exercée sur le développement microbien par l'addition de différents sels (sulfate de magnésium et nucléinate de sodium) et de glucose aux solutions dialysées.

Nous apportons donc dans notre travail tout d'abord une étude physique et chimique de diverses peptones et une appréciation de leur valeur bactériologique; nous apportons, en outre, en nous basant sur des dosages chimiques répétés, effectués avant et après la multiplication bactérienne, une contribution non négligeable à l'étude du métabolisme du bacille pyocyanique.

Le premier chapitre est consacré aux examens physiques et chimiques des peptones, aux dosages des éléments essentiels et à la purification des produits employés.

Après avoir brièvement rappelé les notions actuelles sur la préparation et la constitution des peptones, après avoir passé en revue les principales méthodes utilisées pour différencier ces produits, nous indiquons les techniques que nous avons suivies pour la détermination du pH, du pouvoir rotatoire et de la tension superficielle et pour le dosage chimique des principaux éléments : azote total, azote ammoniacal, azote aminé, carbone, phosphore total, phosphore organique, phosphore minéral, chlorures, sulfates.

Toutes ces mesures physiques et chimiques, effectuées avant et après purification de nos peptones par dialyse, nous ont permis d'opérer sur des milieux suffisamment définis, condition nécessaire à l'étude du métabolisme bactérien.

Le second chapitre est réservé à la détermination de la valeur bactériologique des peptones choisies: peptones ordinaires et peptones dialysées.

Dans ce chapitre, après avoir exposé nos méthodes de numération bactérienne, nous suivons la multiplication du bacille pyocyanique dans les milieux adoptés en dénombrant, à des intervalles rapprochés, les bacilles « résistants » et les bacilles « visibles » présents dans les liquides ensemencés. De plus en éliminant, par filtration, les corps microbiens au

moment où le croît bactérien atteint son maximum et en comparant la composition du filtrat ainsi obtenu à celle du milieu stérile initial, nous apportons quelques observations relatives au métabolisme du bacille pyocyanique. Enfin, en comparant tous les résultats ainsi obtenus, nous déterminons les peptones qui conviennent le mieux au développement de ce bacille.

En dernier lieu, dans *le troisième chapitre*, nous avons essayé d'améliorer nos milieux de culture en additionnant une peptone choisie, préalablement dialysée, de glucose et d'un mélange de sels.

Nous avons ainsi été amenés à comparer la multiplication du bacille pyocyanique dans une solution de peptone ordinaire, dans une solution de cette même peptone dialysée et dans cette dernière solution additionnée soit de glucose, soit d'un mélange de sels, soit enfin de glucose et de cette constante saline.

Dans tous les cas nous avons comparé la composition du milieu stérile initial à celle du même milieuensemencé puis débarrassé des corps microbiens par filtration à la bougie.

Ce travail a été effectué tant au laboratoire de M. R. DAVID à l'Hôpital Bichat, qu'au laboratoire de M. J. RÉGNIER à l'Hôpital Ambroise-Paré.

Nous sommes particulièrement heureux de pouvoir remercier respectueusement M. le Professeur RADAIS, à qui nous devons nos premières notions de bactériologie, et dont l'enseignement nous a été si profitable.

A M. le Professeur HERISSEY, qui a bien voulu nous inscrire dans son laboratoire à la Faculté de Pharmacie, et qui, par son cours et ses travaux pratiques, nous a appris la minutie dans les recherches biologiques, nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance respectueuse.

M. le Professeur agrégé RÉGNIER nous a donné le sujet de cette thèse ; pendant tout le temps qu'en a duré sa préparation, et en toutes circonstances, il a bien voulu nous prodiguer conseils et encouragements : qu'il nous permette de lui en garder une respectueuse et affectueuse reconnaissance. Nous

serons heureux si par ce travail nous lui donnons satisfaction.

M. R. DAVID, Pharmacien des Hôpitaux, pendant nos quatre années d'internat, nous a fait profiter de sa compétence ; il nous a guidé dans nos études et nos travaux, nous le remercions respectueusement de tout ce qu'il nous a appris, et du dévouement qu'il a mis avec conscience à faciliter nos recherches et la présentation de ce travail.

Pour terminer il m'est agréable de pouvoir aussi remercier bien affectueusement mon cousin Roger GAUQUELIN pour l'aide fraternelle qu'il m'a si spontanément donnée. Enfin je suis heureux de pouvoir dire à ma femme combien de tout cœur je lui suis reconnaissant des services qu'elle m'a rendus et du soutien précieux qu'elle m'a apporté.

CHAPITRE PREMIER

LES PEPTONES

EXAMENS PHYSIQUES ET CHIMIQUES, DOSAGES DES ÉLÉMENTS ESSENTIELS ET PURIFICATION

Une rapide révision des notions théoriques et pratiques concernant la préparation, la composition et la différenciation des diverses peptones nous semble nécessaire avant d'aborder l'étude chimique et bactériologique de ces substances.

Le Codex désigne sous le nom de peptones un mélange de composés solubles obtenus par l'action de la pancréatine ou de la pepsine sur les matières albuminoïdes. Il est évident que la composition de ce mélange variera avec la nature des protéides utilisés et avec celle du ferment employé.

Les peptones rencontrées en pharmacie, ou en bactériologie, proviennent principalement de l'hydrolyse des masses musculaires sous l'influence des ferments protéolytiques mais on utilise également des produits obtenus à partir de protéides plus simples : fibrine, gélatine, caséine, etc...

I. — Préparation, caractères et composition des différentes peptones

Suivant le ferment employé, la préparation des peptones s'effectue suivant deux types principaux :

1° Peptones pepsiques

La pepsine n'exerçant son action qu'en milieu acide, le pH nécessaire pourra être obtenu en utilisant différents acides : acide chlorhydrique, acide tartrique ou acide sulfurique par exemple.

a) *Peptones dites chlorhydropepsiques.*

Le mode de préparation en était indiqué au supplément de 1895 du Codex 1884. On prend :

Viande de bœuf désossée et dégraissée ..	1.000 gr.
Eau distillée	5.000 gr.
Pepsine extractive officinale	20 gr.
(titre 50, 1/2 du titre actuel).	
Acide chlorhydrique officinal	50 gr.
Bicarbonate de sodium	Q. S.

La viande hachée est mélangée avec l'eau dans laquelle on a délayé la pepsine. On ajoute l'acide chlorhydrique et on laisse digérer 6 à 8 heures à 50° en agitant fréquemment.

L'opération est terminée quand 10 cc. du liquide filtré *et refroidi* ne troublent plus par addition de XXX gouttes d'acide nitrique.

On filtre, on sature exactement par du bicarbonate de sodium et on évapore à siccité sans dépasser 75°.

La technique exposée ici est due à PETIT (1881) (48). 1 kg. de viande fournit en moyenne 250 gr. de peptone sèche.

Dans la neutralisation, il se forme une assez grande quantité de chlorure de sodium, ce qui peut être un inconvénient pour les usages pharmaceutiques (incorporation à un vin ou à un elixir) ou pour les usages bactériologiques (introduction d'une trop forte proportion de chlorure de sodium dans les milieux de culture).

b) *Peptones dites pepsino-tartriques.*

PETIT avait proposé de remplacer l'acide chlorhydrique par l'acide tartrique. Après filtration, on sépare le liquide en deux fractions égales. On sature une moitié par du bicarbonate de potassium ; on ajoute le reste ; il se forme du bitartrate de potassium dont une partie précipite immédiatement. On filtre,

on évapore à consistance sirupeuse, on laisse refroidir, il se fait encore un dépôt cristallin de bitartrate de potassium. On décante et on évapore au bain-marie à siccité. Ces peptones sont légèrement différentes des précédentes car l'hydrolyse est plus lente et la désintégration plus profonde ; d'après Desnoyers elles renferment une plus grande proportion d'acides aminés.

De plus ce procédé présente l'avantage de donner des peptones exemptes de chlorure de sodium.

Dans le commerce on peut se procurer, parmi ces peptones pepsino-tartriques :

Les peptones Chapotot, préparées à partir de la viande de bœuf ;

Les peptones de Witte, préparées à partir de fibrine de bœuf ou de cheval.

c) *Peptones sulfuriques.*

Il existe également dans le commerce des peptones sulfuriques. Nous avons utilisé une de ces peptones provenant des Laboratoires « Organo-Technie ». Nous en donnerons les principaux caractères et le mode de préparation au paragraphe suivant.

2° **Peptones pancréatiques**

La pancréatine n'agissant normalement qu'en milieu neutre ou faiblement alcalin, la préparation des peptones pancréatiques s'effectuera comme celle des peptones pepsiques mais en supprimant toute addition d'acide et en ajoutant au contraire une petite quantité de carbonate de sodium pour avoir une réaction favorable. (L'addition de carbonate de sodium n'est d'ailleurs pas indispensable).

3° **Caractères et composition**

Les peptones ainsi obtenues sont des produits solides, spongieux ou granulés suivant le mode d'évaporation qui a été employé. Leur couleur est blanc jaunâtre, leur odeur spéciale. Leur saveur amère pour les peptones tryptiques est à la fois

amère et salée pour les peptones chlorhydropepsiques. Les peptones sont entièrement solubles dans l'eau froide et insolubles dans l'alcool très concentré. Les solutions aqueuses, lévogyres, moussent par agitation, elles ne coagulent pas par la chaleur et ne précipitent pas par addition d'acide azotique.

La composition des différentes peptones dépend évidemment de la nature des protéides servant de matières premières à leur fabrication et du ferment utilisé.

Si les matières albuminoïdes employées renferment tous les acides aminés essentiels, ceux-ci se retrouveront libres ou combinés, dans les produits de leur hydrolyse ; si, au contraire, ces matières albuminoïdes ne contiennent pas la gamme complète des principaux acides aminés, les peptones obtenues seront déficientes en certains de ceux-ci. Les peptones de gélatine par exemple, ne renfermeront ni tyrosine, ni tryptophane et ne contiendront que des traces de cystine, celles de caséine seront exemptes de glycocolle. Or, étant donné le caractère indispensable de certains acides aminés : tryptophane, lysine, cystine, pour l'entretien et la croissance des animaux supérieurs, il est à présumer que la présence ou l'absence de tel ou tel acide aminé dans un milieu de culture aura également une influence favorable ou défavorable sur la vie des bactéries.

La composition des peptones dépend également du ferment utilisé pour leur préparation, l'hydrolyse étant beaucoup plus poussée dans le cas de la pancréatine. Sur le processus même de l'hydrolyse, on sait, à vrai dire, fort peu de choses. De nombreuses incursions ont été faites dans ce domaine mais les données acquises restent éparses. La complexité de la molécule joue un rôle, de même l'ordre d'enchaînement des acides aminés et la configuration stéréochimique. La pepsine n'attaque pas la liaison amide, seule employée par FISCHER dans ses polypeptides de synthèse, alors que la trypsine l'attaque. Ceci suggère l'idée de l'existence dans la molécule protéique d'un mode de liaison différent de la fonction amide, car si la liaison amide était seule à intervenir, aucune protéine ne serait attaquée par la pepsine. Citons encore les inté-

ressantes expériences de HUGOUNENQ et LOISELEUR sur des albumines dont ces auteurs ont bloqué les fonctions aminées. La pepsine est sans action, la trypsine agit, ce qui met en évidence la nécessité de l'intégrité des fonctions aminées pour l'attaque pepsique.

Sur ces faits apparemment sans liens, on ne peut qu'échafauder des théories plus ou moins éphémères.

Du point de vue qui nous intéresse, seul est capital le résultat de l'hydrolyse, et ce résultat est bien différent suivant que l'agent d'hydrolyse est soit la pepsine, soit la pancréatine. MEISSNER le premier (1854) signala que la digestion protéidique par la pepsine est incomplète.

KUHNE (1876) confirma ce fait, ajoutant que la trypsine attaque les produits d'hydrolyse incomplète de la pepsine avec formation d'acides aminés, mais en laissant toutefois un nouveau résidu inattaquable par les deux enzymes.

Pour concrétiser ces données, on fabriqua des noms. Les peptones pepsiques étaient des « amphopeptones » parce que constituées de deux groupes : l'un inattaquable par les enzymes « antipectone » ; l'autre attaquant par la seule enzyme pancréatique « hémipeptone » et hydrolysable en acides aminés.

Mais ce sont là, en partie, ce que nous pourrions appeler des vues de l'esprit et pour le praticien l'important est de savoir que les peptones pepsiques ne renferment que des albumoses, des peptones et des polypeptides abiurétiques et qu'on n'y trouve pas normalement d'acides aminés libres sauf des traces de tyrosine, tandis que les peptones pancréatiques contiennent toujours des acides aminés, notamment du tryptophane, de la tyrosine et de la leucine.

Cette surabondance d'acides aminés, dont quelques-uns spécifiques, dans les peptones pancréatiques leur donnera des caractères particuliers qui permettront de les différencier des peptones pepsiques :

a) soit par des mesures physiques :

tension superficielle augmentée chez les peptones pancréatiques, pouvoir rotatoire gauche plus fort pour les peptones pepsiques ;

b) soit par des réactions chimiques mettant en évidence les acides aminés spécifiques :

réaction à l'eau de brome pour le tryptophane ;

réaction de la tyrosinase pour la tyrosine ;

examen des cristaux de leucine et de tyrosine ;

c) soit par des mesures chimiques quantitatives.

D'après JAVILLIER et GUÉRITHAUT (31), le rapport :

Azote titrable au formol

Azote total

est supérieur à 20 pour les peptones pancréatiques et inférieur à ce chiffre pour les peptones pepsiques.

II. — Peptones utilisées dans nos essais

Nous avons utilisé dans nos essais un certain nombre de peptones, les unes provenant du commerce, les autres étant préparées par nous au laboratoire. Nous donnons ci-dessous la liste de ces peptones, en indiquant en même temps leurs principaux caractères, et en les affectant chacune d'un numéro d'ordre qui servira à les distinguer dans le cours de nos expériences.

1° Peptones pancréatiques

Peptone pancréatique N° 1. — Cette peptone, délivrée par les laboratoires Bioty sous la dénomination « Peptone de viande (poudre Codex) » se présente sous forme d'une poudre légèrement jaunâtre, de saveur amère, entièrement soluble dans l'eau froide.

Pour la préparer, on part de la viande totale qu'on broie avec environ 5 fois son poids d'eau afin d'obtenir une bouillie facile à filtrer rapidement. Après avoir filtré, on ajoute la pancréatine dans la proportion de 1 gr. de ferment pour

250 gr. de viande fraîche, et on porte à l'étuve à 55° pendant 6 ou 7 heures.

On élève ensuite la température à 90 ou 95° pour coaguler l'excès d'albumine et tuer le ferment, puis on filtre.

On concentre cette solution d'abord à l'air, puis dans le vide.

Peptone pancréatique N° 2. — Peptone pancréatique de viande de bœuf préparée par les établissements Byla et mise en vente sous le nom de « Peptone bactériologique ». C'est une poudre de couleur blanc-jaunâtre, de saveur amère, complètement soluble dans l'eau froide.

Peptone de gélatine N° 3. — Cette peptone nous a été fournie par les laboratoires de l'Organo-Technie sous le nom de « peptone de gélatine » (1).

Elle est préparée d'après la technique suivante :

La gélatine, soit en feuille, soit en grain, est mise à gonfler dans l'eau distillée à la température ordinaire pendant 12 heures environ.

On la porte ensuite au bain-marie maintenu à une température de 45° à 48°. Lorsque la masse gélatineuse, que l'on remue avec soin, a atteint cette température, on ajoute la pancréatine ou mieux du pancréas frais. On remue vigoureusement jusqu'à liquéfaction totale puis de temps à autre. Au bout de 6 heures environ on fait une prise d'essai sur laquelle on opère l'essai à l'acide azotique. Quand il n'y a plus de précipité par l'acide azotique, on arrête la digestion, on filtre, on concentre dans le vide à consistance pâteuse. Cette pâte est ensuite séchée sur des plateaux dans le vide à 37°. On obtient une masse spongieuse de couleur blanc crème qui, à la pulvérisation, donne une poudre blanche, de saveur à peine amère et entièrement soluble dans l'eau froide, quoique moins rapidement que les précédentes.

Peptone de caséine N° 4. — « Peptone de caséine, poudre » des laboratoires Bioty. Elle se prépare en partant de la caséine du lait, coagulée et desséchée, qu'on émulsionne avec

(1) Nous adressons tous nos remerciements à ce laboratoire qui nous a fourni ce produit à titre gracieux.

5 fois son poids d'eau. Le mode opératoire est ensuite le même que pour la peptone pancréatique N° 1.

On obtient ainsi une poudre jaune tirant sur le brun dont la saveur est désagréable et un peu amère ; elle est très soluble dans l'eau.

Peptone de caséine N° 5. — Cette peptone a été préparée par nous au laboratoire, en utilisant la technique préconisée par E. BACHRACH. On prend :

Caséine pulvérisée	200 gr.
Pancréatine officinale	20 gr.
Eau distillée : q. s. p.	1.500 cc.

On délaie la caséine dans un petite quantité d'eau distillée, on ajoute la pancréatine, on mélange le tout de façon à obtenir une bouillie bien homogène et on complète à 1.500 cc. avec de l'eau distillée.

Le mélange abandonné à l'étuve à 50° pendant 24 heures est ensuite filtré sur un linge fin. On obtient ainsi un liquide brun foncé, filtrant facilement, qui, évaporé à basse température, nous aurait donné la peptone cherchée.

Nous avons préféré éviter cette opération et nous avons conservé cette peptone sous forme de solution stérile. Pour cela la solution obtenue a été complétée à 1.500 cc. par addition d'eau distillée, ajustée à pH 7,0 par addition de soude N/10, et stérilisée à l'autoclave pendant 10 minutes à 120°. Le chauffage à l'autoclave provoquant la formation d'un précipité notable, on filtre la solution stérile ainsi obtenue, on ramène la réaction à pH 7,0 si cela est nécessaire, on complète à 1.500 cc. par addition d'eau distillée et on stérilise à nouveau pendant 15 minutes à 120°. On obtient ainsi un liquide clair, brun foncé, à saveur amère, renfermant par litre 14 gr. 28 d'azote total et 105 gr. 36 d'extrait sec. On l'utilisera au moment du besoin. Il est à noter que l'ajustage de la liqueur à un pH déterminé, en utilisant la méthode colorimétrique, est rendu difficile par suite de la coloration de la solution.

2° Peptones pepsiques

Peptone pepsique N° 6. — Cette peptone de viande, utilisée à la pharmacie centrale des hôpitaux pour l'essai des catguts, a été préparée spécialement dans ce but par les laboratoires Byla ⁽¹⁾.

Elle se présente sous forme d'une poudre jaune pâle, à saveur amère et salée, très soluble dans l'eau.

Peptone pepsique N° 7. — Cette peptone, préparée par les Laboratoires Byla, est délivrée dans le commerce sous la dénomination de « Peptone Codex ».

Elle se présente en masses jaunes pâles, spongieuses, sa saveur est salée et amère. Elle est entièrement soluble dans l'eau.

Peptone de fibrine N° 8. — « Peptone de fibrine » préparée par les Laboratoires Byla.

C'est une poudre jaune foncé, soluble dans l'eau, de saveur salée et amère.

Peptone de muqueuses N° 9. — Cette peptone, mise à notre disposition par les Laboratoires de l'Organo-Technie, se prépare par digestion pepsique, en milieu sulfurique, de la façon suivante :

Les muqueuses d'estomac de porc sont lavées soigneusement, hachées finement et portées au bain-marie dans de l'eau distillée additionnée d'acide sulfurique. On porte le bain-marie à 45° et on remue soigneusement la masse jusqu'à liquéfaction totale des muqueuses. Après un séjour d'environ 6 heures on opère la touche à l'acide azotique. Dès que celle-ci donne un résultat négatif on arrête la digestion. On filtre pour séparer les parties non digérées et on traite la liqueur obtenue par un lait de chaux jusqu'à saturation exacte de l'acide sulfurique. On laisse déposer, on siphonne le liquide surnageant, on le filtre et on le concentre dans le vide à 45° à l'état de pâte. Celle-ci est ensuite séchée dans le vide à 37°. On obtient une masse spongieuse jaune paille qui, avant d'être pulvérisée,

(1) Nous remercions particulièrement M. Liot, pharmacien supérieur, adjoint à Monsieur le Directeur de la Pharmacie centrale des Hôpitaux, pour avoir bien voulu mettre à notre disposition une certaine quantité de cette peptone.

est dissoute dans une petite quantité d'eau. On filtre ensuite à limpidité parfaite, on concentre jusqu'à dessiccation complète dans le vide, et on pulvérise.

L'échantillon sur lequel nous avons fait nos essais se présentait sous la forme de masses spongieuses, très soluble dans l'eau et de saveur amère mais non salée.

Peptone de caséine N° 10. — Cette peptone a été préparée par nous en suivant, comme pour la peptone pancréatique de caséine, le mode opératoire proposé par E. BACHRACH. On prend :

Caséine pulvérisée	200 gr.
Pepsine en paillettes (titre 100)	20 gr.
Acide chlorhydrique pur officinal	15 gr.
Eau distillée : q. s. p.	1.500 cc.

On délaie la caséine dans une petite quantité d'eau, on ajoute la pepsine ; on agite de façon à obtenir une bouillie homogène et on verse enfin l'acide chlorhydrique et le reste de l'eau distillée de façon à obtenir un volume de 1.500 cc.

Le mélange est placé pendant 24 heures à l'étuve à 50°, puis filtré sur un linge. La filtration est ici beaucoup plus lente que dans le cas de la peptone pancréatique et il reste sur le filtre un résidu important, tandis qu'avec la pancréatine la solubilisation avait été presque complète.

Ici encore nous n'avons pas cherché à obtenir la peptone sèche et nous avons préparé simplement une solution mère stérile en opérant comme pour la peptone pancréatique. Le filtrat précédent, moins coloré que le liquide de digestion pancréatique, a été ajusté à pH 7,0, par addition de soude N/10, et complété à 1.500 cc. par addition d'eau distillée. Un premier chauffage de 10 minutes à 120° ayant provoqué la formation d'un précipité abondant, la solution mère de peptone a été filtrée à nouveau, son volume a été reconstitué à 1.500 cc. et sa réaction a été ramenée à pH 7,0. Le liquide ainsi obtenu renferme par litre 4 gr. 76 d'azote total et 44 gr. 97 d'extrait sec ; on le stérilise définitivement pendant 15 minutes à 120°.

On obtient ainsi une solution de couleur brune, mais moins

foncée que la solution de peptone pancréatique et possédant une saveur amère et salée (1).

3° Déterminations physiques et chimiques effectuées
dans nos essais

Préparation des solutions de peptones. — En possession de ces différentes peptones, nous avons essayé de les caractériser et de les définir le plus exactement possible en utilisant pour cela, non seulement les réactions préconisées par les différents auteurs, mais encore en mettant à profit un certain nombre de techniques de dosage récemment entrées dans la pratique des laboratoires de chimie biologique. Nous avons donc procédé, sur des solutions des diverses peptones, aux déterminations suivantes :

mesure du pH, de la déviation polarimétrique et de la tension superficielle ;

recherche de la tyrosine, de la leucine et du tryptophane ;

dosages de l'azote total, de l'azote amino-ammoniacal, de l'azote ammoniacal, de l'azote aminé, du carbone, du phosphore total, du phosphore organique, du phosphore minéral, des chlorures et des sulfates.

Toutes les mesures physiques et tous les dosages chimiques ont été effectués sur les eaux peptonées mêmes qui nous ont servi à la culture du bacille pyocyanique.

La préparation de tous ces milieux a toujours été conduite d'après le type suivant. On prend :

Peptone	10 gr.
Eau distillée	1.000 cc.

On fait dissoudre la peptone dans l'eau en chauffant doucement et en agitant continuellement. On porte ensuite la solution à l'ébullition et on maintient celle-ci pendant une minute environ.

(1) MM. Badreau des Laboratoires de l'Organo-Technie, et Tixier des Laboratoires Bioty ont bien voulu nous communiquer les renseignements que nous venons de rapporter au sujet de la préparation des peptones obtenues sous leur contrôle; ils ont mis un grand empressement à nous être agréables et nous sommes très heureux de les en remercier.

Après refroidissement on ajuste à pH 7,0 au moyen de lessive de soude diluée en utilisant la méthode colorimétrique. On complète ensuite au volume initial, diminué de la quantité utilisée pour l'alcalinisation, au moyen d'eau distillée.

Il ne reste plus qu'à filtrer, répartir dans des récipients convenables en pyrex et stériliser pendant 20 minutes à 115°.

Certaines peptones pepsiques (peptone de muqueuses, peptone de fibrine, peptone pepsique N° 6) présentent après cette première stérilisation un trouble plus ou moins prononcé. Dans ce cas la solution stérile refroidie est filtrée, le pH est vérifié et ramené à 7,0, si cela est nécessaire, le volume initial est reconstitué par addition d'eau distillée et le liquide ainsi obtenu est stérilisé une seconde fois pendant 20 minutes à 115°.

Quand la préparation des milieux s'effectue à partir des solutions concentrées de peptones préparées par nous, il suffit de remplacer les 10 grammes de peptone sèche par la quantité de solution concentrée donnant, par évaporation à 100°, 10 grammes d'extrait sec. Cette quantité est déterminée par un essai préalable portant sur 10 cc. de solution concentrée. La préparation se continue alors comme dans le cas général.

Sur les solutions ainsi obtenues nous procédons aux essais suivants.

III. — Méthodes utilisées pour définir les solutions de peptones employées

Nous avons choisi, pour caractériser et pour définir le mieux possible les solutions de peptones utilisées comme milieux de culture, des techniques simples dont l'exactitude a été bien démontrée. Ces techniques sont les suivantes :

Mesures physiques

1° *Mesure du pH.* — La multiplication microbienne modifie constamment la réaction des milieux de culture. Nous avons

donc été amenés à déterminer le pH de nos solutions de peptones en utilisant pour cela la méthode colorimétrique avec les indicateurs et les gammes étalons de CLARK et LUBS.

2° *Tension superficielle.* — Les peptones abaissent la tension superficielle de l'eau et sont dégradées par le métabolisme bactérien. Nous pouvons donc suivre, en partie, les modifications survenant dans la composition des milieuxensemencés en comparant la tension superficielle du milieu initial stérile à celle du même milieuensemencé, puis débarrassé des corps microbiens par filtration à la bougie. Dans nos essais la tension superficielle a été déterminée en comptant le nombre de gouttes données par 5 cc. de liquide. Nous avons utilisé pour cela une pipette de DUCLAUX donnant, à la température ordinaire, 100 gouttes d'eau distillée par 5 cc.

3° *Déviatiopolarimétrique.* — La mesure de la déviatiopolarimétrique a été faite à l'aide du polarimètre de Laurent en nous servant d'un tube de 1 décimètre de longueur. Cette déviatiopolarimétrique, qui varie avec l'hydrolyse des matières protéiques, nous servira non seulement à différencier les peptones pepsiques des peptones pancréatiques, mais nous permettra également de suivre la dégradation des peptones sous l'influence de la croissance microbienne. Rappelons que d'après HARLAY (25) les peptones pancréatiques ont un pouvoir rotatoire égal ou inférieur à -40° tandis que les peptones pepsiques ont un pouvoir rotatoire voisin de -50° .

Malheureusement nous n'avons pas pu déterminer dans tous les cas ce pouvoir rotatoire, la lecture est en effet souvent difficile, parfois même impossible par suite de la coloration des liquides surtout lorsqu'on examine les milieuxensemencés.

Examens chimiques qualitatifs

Ces essais chimiques ont pour but de mettre en évidence, dans la constitution des peptones, la tyrosine, la leucine et le tryptophane. Ils devront donc donner des résultats positifs lorsqu'on s'adresse à une peptone pancréatique et des résultats négatifs lorsqu'on examinera une peptone pepsique. Ces essais sont conduits de la façon suivante :

1° *Réaction de la tyrosinase.* — Cette réaction, dont l'importance a été soulignée par HARLAY (25), a pour but de caractériser la tyrosine présente dans les peptones pancréatiques. Cet auteur a montré que la tyrosinase oxyde la tyrosine en donnant d'abord une coloration rouge qui vire progressivement au noir puis un précipité noir de mélanine.

HARLAY utilise comme source de tyrosinase un champignon, le *Russula delica*, très riche en cette oxydase et donnant un macéré qui ne se colore pas spontanément à l'air. Nous avons préparé ce macéré et effectué la réaction en suivant exactement les indications de cet auteur.

a) Préparation de la macération de *Russula delica* :

On prend :

Russula delica 250 gr.

Glycérine 850 gr.

On réduit le champignon en pâte et on triture avec la glycérine ; on fait macérer une heure après quoi on filtre. On obtient un liquide limpide à peine teinté en jaune qui nous servira pour nos essais.

b) Réaction proprement dite :

On mesure 5 cc. d'une solution de peptone à 2 % et on y ajoute 1 cc. de la macération de *Russula*.

Avec les peptones pepsiques on obtient une teinte rouge qui passe au bout de quelques heures au vert olive, vire au rouge par l'ammoniaque et redevient verte par addition d'acide chlorhydrique.

Avec les peptones pancréatiques on obtient une coloration rouge, devenant brun noir, et qui n'est pas modifiée par l'ammoniaque.

Dans nos essais nous avons observé ces colorations qui ont toujours été assez nettes et nous ont permis, avec l'examen microscopique, d'affirmer la présence ou l'absence de tyrosine.

2° *Formation de cristaux de leucine et de tyrosine.* — Les peptones pancréatiques renferment toujours, indique le CODEX, de la tyrosine et de la leucine. Pour mettre en évidence ces acides aminés nous avons repris le mode opératoire indiqué par M. JAVILLIER (30).

Nous avons préparé des solutions aqueuses de peptones à 10 %, nous les avons filtrées et avons prélevé dans chaque cas 25 cc. de solution que nous avons fortement concentrée au bain-marie jusqu'à réduction du volume à quelques centimètres cubes seulement.

Nous avons examiné cette solution au microscope et pour les peptones pancréatiques, à part l'exception signalée plus loin, nous avons constaté la présence de cristaux de leucine et de tyrosine. Les premiers se présentaient en fines lamelles, larges, superposées, dont les contours ont été difficiles à observer ; les fines aiguilles de tyrosine étaient parfois isolées, mais elles étaient toujours mélangées de groupes d'aiguilles disposées soit en houpes simples ou doubles, soit en gerbes ou même en rosaces.

3° *Réaction à l'eau de brome.* — Le CODEX, pour différencier les peptones pepsiques des peptones pancréatiques, indique de verser de l'eau de brome dans une solution aqueuse de ces peptones ; avec les peptones pepsiques il se produira un précipité jaune, avec les peptones pancréatiques une coloration rouge violacée intense passant au brun par excès de réactif.

Dans notre travail nous avons fait cet essai en suivant les indications du CODEX. Nous avons observé les colorations prévues. Avec les peptones pancréatiques il faut cependant noter une légère différence : l'eau de brome a bien donné une teinte rouge mais elle n'était pas toujours rouge violacée.

Examens chimiques quantitatifs

Ces déterminations ont porté sur les principaux éléments des peptones : azote total, azote amino-ammoniacal, azote ammoniacal, azote aminé, carbone, phosphore total, phosphore organique et phosphore minéral, chlorures, sulfates.

1° DOSAGE DE L'AZOTE SOUS SES PRINCIPALES FORMES

A) AZOTE TOTAL.

Le dosage se fait en deux temps :

1° Destruction de la matière organique à chaud par l'acide

sulfurique en présence d'un catalyseur. La totalité de l'azote donne de l'ammoniaque combinée à l'acide sulfurique.

2° Dosage acidimétrique de l'ammoniaque libérée par un alcali fixe.

Pour la destruction nous avons employé la méthode de DENIGES.

Nous versons 10 cc. de notre solution de peptone (quelquefois 25 cc. pour les milieux pauvres) dans un matras de KJELDAHL de 300 cc. en pyrex ; nous y ajoutons 5 cc. d'une solution d'oxalate neutre de potassium à 30 %, 5 cc. d'acide sulfurique pur et nous procédons au chauffage en suivant le mode opératoire habituel. La décoloration est généralement obtenue au bout de 2 heures de chauffage mais nous poursuivons celui-ci pendant 4 heures pour assurer une destruction complète. On laisse ensuite refroidir, on ajoute dans le matras de KJELDAHL un peu d'eau distillée, quelques gouttes de phénolphthaléine et on neutralise presque complètement avec de la lessive de soude tout en refroidissant le mélange ; on transvase alors le liquide ainsi obtenu dans un ballon jaugé de 50 cc., on ajoute les eaux de lavage du matras, et on complète au trait de jauge.

Le dosage de l'ammoniaque s'effectue sur la moitié de la prise d'essai. Pour cela on prélève 25 cc de notre solution qu'on introduit dans l'appareil de MEILLÈRE et de SAINT-RAT (37). On alcalinise avec 1 cc. 5 environ de lessive de soude, et on distille. On recueille l'ammoniaque qu'on titre au fur et à mesure de son dégagement par de l'acide sulfurique décinormal en présence d'alizarine sulfonate de sodium comme indicateur (39).

La distillation dure à peu près huit minutes. Soit N le nombre de centimètres cubes d'acide sulfurique $N/10$ employé pour une prise d'essai de 10 cc., l'azote total du milieu analysé est donné en grammes par litre par la relation :

$$\text{Az. total par litre} = 0 \text{ gr. } 0014 \times 2 N \times 100.$$

Nous savons que la méthode de DUMAS donne des résultats supérieurs à celle que nous venons d'indiquer. W. MESTREZAT (40, 41, 44) a montré que cette erreur par défaut provient de

ce que différents composés azotés : nitrates, nitrites, pyridine, etc., sont à peine dosés par la technique de KJELDAHL. Ces molécules sont peu nombreuses dans nos milieux et nous pensons qu'au point de vue comparatif, nos résultats conservent toute leur valeur.

Récemment d'ailleurs, M. LEMOIGNE, O. DOPTER et R. DESVEAUX (36), en procédant comparativement, par la méthode de DUMAS et par celle de KJELDAHL, au dosage de l'azote total contenu dans des bouillons de haricots peptonés à 10 0/00, ont constaté que si la technique de KJELDAHL donne des résultats inférieurs à celle de DUMAS, les différences observées sont toujours faibles et restent comprises entre 0,35 et 6 %.

B) AZOTE AMINO-AMMONIACAL.

Nous avons employé la méthode de SÖRENSEN modifiée par MESTREZAT (38).

Cette méthode consiste à traiter une solution mixte de sels ammoniacaux et d'acides aminés, préalablement neutralisée, par le formol et à titrer alors l'acidité libérée.

Dans le cas des sels ammoniacaux, l'addition de formol a pour résultat de transformer l'ammoniaque en urotropine avec libération concomitante de l'ion acide, titrable alcalimétriquement. La neutralisation sera complète dès le virage au rose de la phénolphthaléine.

Quant aux acides aminés, leur fonction amine se trouve bloquée sous l'action du formol et leur fonction acide restant seule en jeu devient titrable alcalimétriquement. Mais le sel alcalin qu'ils forment alors est le sel d'un acide faible avec une base forte, sel fortement hydrolysé et alcalin à la phénolphthaléine. Il ne faut donc pas, comme dans le cas précédent, se contenter du virage au rose de la phtaléine, mais pousser au rouge franc, teinte indiquant un pH où la totalité des acides aminés doit être neutralisée. Pour être sûr d'obtenir cette teinte on préparera préalablement un témoin. Enfin il faudra débarrasser la solution des acides faibles (carbonates et phosphates) qui gêneraient le virage.

D'où trois temps à considérer :

Préparation du témoin ;

**Elimination des carbonates et des phosphates ;
Titrage.**

1° Préparation du témoin.

On neutralise 10 cc. de formol, on y ajoute 30 cc. d'eau distillée bouillie (pour avoir un volume voisin du volume final du dosage), X gouttes de solution alcoolique de phénolphtaléine à 1 % et 0 cc. 4 de soude décinormale pour avoir une teinte rouge franc. Nous avons opéré dans une fiole conique de 60 cc.

2° Elimination des phosphates et des carbonates.

On les précipite à l'état de sels de baryum insolubles en milieu alcalin.

On prend un flacon jaugé de 50 cc. dans lequel on verse 25 cc. de solution de peptone, 2 gouttes de solution de phénolphtaléine et 1 gr. de chlorure de baryum pulvérisé. On agite pour dissoudre le sel et on ajoute alors un excès d'eau de baryte (2 cc. 5 après avoir obtenu le virage). Il est important d'opérer en flacon bouché pour éviter les pertes d'ammoniaque. On laisse reposer 15 minutes, après quoi on complète à 50 cc. avec de l'eau distillée bouillie et on filtre rapidement.

3° Dosage de l'azote amino-ammoniacal.

Prélever sans tarder 20 cc. de filtrat, correspondant à 10 cc. de solution de peptone, les verser dans une fiole conique de 60 cc. et les décolorer par addition d'acide chlorhydrique à 2 %. Ajouter au liquide X gouttes de solution alcoolique de phénolphtaléine et quelques gouttes de solution décinormale de soude pour obtenir une teinte rose pâle.

Verser alors dans le mélange 10 cc. de formol neutralisé (formol identique à celui qui a été utilisé pour préparer le témoin) et ajouter goutte à goutte la solution décinormale de soude jusqu'à ce qu'on obtienne une teinte rouge comparable à celle du témoin.

Soit N le nombre de centimètres cubes de soude employée. En retranchant de N les 0 cc. 4 employés pour colorer le témoin on obtient un nouveau nombre n qui représente le volume de solution décinormale de soude utilisée pour la neu-

tralisation des fonctions acides libérées par le formol. Le nombre n , multiplié par 0 gr. 001414, représente en azote, correction faite pour tenir compte du retard apporté au virage par les sels ammoniacaux, la somme Az aminé + Az ammoniacal existant dans 10 cc. d'eau peptonée.

L'azote amino-ammoniacal est donc donné, en grammes par litre, par la relation :

$$\text{Az. amino-ammoniacal} = 0 \text{ gr. } 001414 \times n \times 100.$$

c) AZOTE AMMONIACAL.

Le dosage a été effectué au moyen du procédé à la cloche de SCHLOESING. W. MESTREZAT (42, 43), en opérant sur l'urine a montré la valeur de cette méthode. Celle-ci donne une légère erreur par excès, puisqu'on agit en même temps sur la créatinine et sur l'acide urique, mais dans notre cas cette erreur est bien faible car ces deux éléments n'existent qu'en très faibles quantités dans les solutions de peptone.

Nous utilisons le dessiccateur préconisé par MESTREZAT et nous opérons de la façon suivante :

30 cc. de milieu stérile, ou 20 cc. de milieu ensemencé sont versés au fond d'un dessiccateur. On ajoute 2 cc. d'acide sulfurique au 1/4, pour détruire les ferments solubles qui peuvent exister dans le liquide, on laisse reposer un quart d'heure, après quoi on verse 12 cc. d'un lait de chaux à 20 %.

Dans la partie supérieure du dessiccateur on place un cristalliseur de 7 à 8 cm. de diamètre contenant 10 cc. d'acide sulfurique N/10. On ferme rapidement le dessiccateur (on aura eu soin auparavant de bien vaseliner le couvercle) et au bout de 3 jours, pendant lesquels l'appareil a été laissé à la température du laboratoire, on titre l'acide combiné à l'ammoniaque dégagée. Dans ce but on met dans le cristalliseur 10 cc. de soude N/10, 2 ou 3 gouttes d'alizarine sulfonate de sodium et on titre la soude en excès par l'acide sulfurique N/10. Soit N le nombre de centimètres cubes d'acide sulfurique employé, l'azote ammoniacal contenu dans la prise d'essai est donné en grammes par la relation :

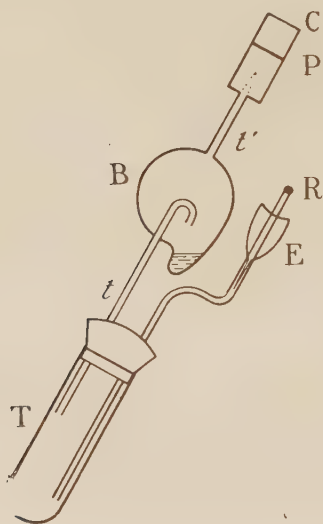
$$\text{Az. ammoniacal} = N \times 0,0014.$$

D) AZOTE AMINÉ.

L'azote aminé est obtenu par différence entre l'azote amino-ammoniacal et l'azote ammoniacal.

2° DOSAGE DU CARBONE

Nous nous sommes servi de la méthode préconisée par NICLOUX (46) dont le principe est le suivant : On utilise un dispositif dans lequel on a fait le vide. Les matières organiques oxydées par un mélange argento-sulfochromique cèdent leur carbone sous forme de gaz carbonique. On laisse dégager ce gaz dans une partie du dispositif où il est absorbé spontanément par de la potasse.



On obtient ainsi la totalité du gaz carbonique sous forme de carbonate de potassium soluble qu'on précipite à l'état de carbonate de baryum insoluble et qu'on isole par centrifugation.

Le précipité lavé est repris par de l'acide chlorhydrique titré en excès. Le gaz carbonique libéré est chassé par ébullition et l'excès d'acide chlorhydrique est dosé alcalimétriquement.

Nous allons d'abord décrire le dispositif utilisé puis donner les préparations des réactifs nécessaires et parler du dosage proprement dit.

A). — Appareil.

Il comporte : un tube à essai T en verre pyrex de 14 millimètres de diamètre intérieur et de 120 millimètres de hauteur, un bouchon de caoutchouc percé de deux trous traversés l'un par un tube à entonnoir E et l'autre par un tube à boule t B t'. La partie t de ce tube effilée et courbée pénètre à l'intérieur de la boule B ; cette dernière présente un renflement dans l'axe du tube recourbé. Un tube de caoutchouc à vide C fermé par une pince de Mohr P coiffe l'extrémité du tube t'.

La fermeture du tube à entonnoir E s'effectue avec un tube en verre plein R effilé à sa partie inférieure (fig. p. 26).

B). — Réactifs.

Il est nécessaire qu'ils soient préparés suivant les techniques indiquées, car ils doivent être rigoureusement purs.

Bichromate de potassium pur. — On utilise le sel cristallisé qu'on pulvérise. Une petite mesure de dimension convenable soufflée à l'extrémité d'un tube de verre, permettra de prélever la quantité voulue.

Chromate neutre de potassium. — On fait une solution de chromate de potassium qu'on concentre ; on fait cristalliser deux fois le sel et on le pulvérise.

Chromate d'argent. — On précipite 5 gr. de nitrate d'argent dissous dans 25 cc. d'eau, par 3 gr. de chromate neutre de potassium préparé comme nous venons de le dire et dissous dans 50 cc. d'eau. On lave le précipité par décantation et on le sèche dans un tube à l'étuve à 35°.

Solution de potasse environ 2 N. et rigoureusement décarbonatée. — On prend 150 gr. de potasse pure qu'on dissout dans 1.000 cc. d'eau distillée. On ajoute petit à petit une solution faite à chaud et bouillante de 10 gr. de baryte dans 100 cc.

d'eau. On verse la baryte tant qu'il se fait un précipité, puis un petit excès ensuite ; la solution de potasse est alors débarrassée du carbonate qu'elle contenait. On laisse déposer puis on verse la solution décantée dans une burette de Baudoin, en ayant soin de disposer une garde à chaux sodée entre la poire en caoutchouc et la burette.

Acide sulfurique. — Concentré pur.

Potasse et acide chlorhydrique normaux au vingtième. — Nous avons utilisé des solutions normales au 1/20 de potasse et d'acide chlorhydrique et nous les avons colorées au rouge de méthyle.

Pour ce faire nous avons trituré dans un tout petit mortier 10 cgr. environ de rouge de méthyle avec quelques gouttes de soude N/10 et nous avons ajouté 3 à 5 gouttes de l'indicateur ainsi préparé pour un litre de solution alcaline ou acide.

La solution alcaline est ainsi colorée en jaune serin et la solution acide en rouge groseille.

C). — Dosage proprement dit.

Le dosage comporte plusieurs opérations, il faut d'abord préparer les substances pour l'attaque sulfo-chromique, effectuer cette attaque sulfo-chromique puis doser pour finir le gaz carbonique provenant de l'oxydation du carbone.

Dans nos essais nous avons opéré sur 0 cc. 5 d'eau peptonée prélevée avec une pipette de 1 cc., graduée en 1/100 de centimètre cube ; de cette façon la quantité de carbone dosé était comprise entre 1 et 3 mmgr, comme le recommande NICLOUX.

La technique du dosage proprement dit que nous donnons maintenant est celle de l'auteur ; nous l'avons rigoureusement suivie.

« 1° *Préparation de la substance pour l'attaque argento-sulfo-chromique.*

Le prélèvement est introduit dans le tube à essai T ; on y ajoute successivement : 50 à 60 mmgr. de chromate d'argent, 220 à 240 mmgr. de bichromate de potasse ou 300 mmgr. de chromate neutre, prélevés avec les petites mesures en verre

dont j'ai parlé et enfin une quantité de sulfate de soude anhydre approximativement le double de la quantité d'eau apportée par la dissolution aqueuse ; à savoir : 0 gr. 6 pour 0 cc. 3, 1 gr. pour 0 cc. 5, etc... Le contenu du tube se présente ainsi sous forme d'un magma solide. D'autre part, on a introduit dans la boule B, au moyen d'un petit tube de caoutchouc placé sur la partie t' du tube t B t', 0 cc. 4 à 0 cc. 5 de la solution de potasse 2 N rigoureusement exempte de carbonate.

On bouche le tube T avec son bouchon de caoutchouc, on y adapte ensuite le tube t B t' dont on fait pénétrer, en forçant, l'extrémité humectée d'un peu d'eau, dans le trou du bouchon qui lui est réservé, puis on met une goutte d'acide sulfurique dans le tube à entonnoir E ; la fermeture est ainsi parfaite.

On met alors le tube de caoutchouc C en communication avec une bonne trompe à eau, on fait le vide dans l'appareil. Le vide obtenu, on ferme la pince P et on rompt la communication avec la trompe. Dès lors l'appareil est clos et se maintiendra vide d'air à la seule condition que la fermeture du tube à entonnoir E soit étanche.

On plonge sans crainte le tube T dans un bain-marie d'eau bouillante, la distillation du faible volume d'eau de 0 cc. 3 à 0 cc. 5 qui accompagne la substance à analyser est très rapide grâce au vide qui règne dans l'appareil. Le contenu du tube est desséché en quelques instants en même temps que l'eau se condense dans la boule B que l'on peut refroidir avec du papier à filtre humecté d'eau simplement par un jet de pissette. Il n'y a pas à craindre de projection, l'eau ne quittant le magma que progressivement et c'est là la première utilité du sulfate de soude. On retire alors le tube du bain-marie, on suspend l'appareil à un support en l'inclinant légèrement par rapport à la verticale et on attend un instant qu'il soit refroidi.

2° *Attaque argento-sulfochromique.*

On va procéder maintenant à la combustion proprement dite. Par le tube à entonnoir E, on introduit 6 cc. environ d'acide sulfurique pur concentré. Le mélange sulfochromique

dont l'action est renforcée par le chromate d'argent attaque la matière carbonée immédiatement. On chauffe avec un bec en veilleuse, le sulfate de soude favorise la réaction en élevant le point d'ébullition de l'acide. L'acide carbonique se dégage. Il est bon à ce moment de retirer l'appareil de son support et de promener la potasse sur toute la surface de la boule par des mouvements limités, mais suffisants, de tout l'appareil. Après quelques minutes, le dégagement gazeux diminue, puis paraît cesser. Là est le seul point délicat de l'opération, il faut en effet éviter tout soubresaut en chauffant doucement et n'en continuer pas moins à chauffer pour provoquer un dégagement d'oxygène aux dépens de l'acide chromique. Ce dégagement amorcé, il devient très régulier, relativement vif, il balaie vraisemblablement tout le tube des dernières traces d'acide carbonique qu'il peut contenir. On procédera à nouveau à un renouvellement des surfaces de la potasse dans la boule B par la manœuvre décrite précédemment, et on répétera cette opération une troisième fois quelques instants plus tard. Le contenu du tube tend à verdier, la pression dans l'appareil reste négative, comme on peut s'en assurer par l'abaissement du niveau de l'acide sulfurique dans le tube à entonnoir E, quand on soulève légèrement le tube R.

Après une dizaine de minutes, le dégagement d'oxygène ayant à son tour cessé, le contenu du tube est devenu vert. C'est qu'en effet le chromate d'argent et le bichromate de potasse ont été décomposés en donnant naissance à du sulfate de sesquioxyde de chrome vert, quelquefois même à un précipité grisâtre qui serait le sulfate $(\text{SO}_4)_3 \text{Cr}_2$, SO_4H_2 , et qui rend le liquide trouble. Quelques vapeurs blanches d'acide sulfurique peuvent se former au-dessus du liquide et ont tendance à pénétrer dans le tube t, ce qui est sans inconvénient, même si elles arrivaient en petite quantité jusque dans la boule B, ainsi que je le montrerai. La pression jusqu'ici négative peut devenir légèrement positive. L'attaque est terminée. On ouvre doucement la pince P si la pression est positive ; si elle est négative, on peut mettre l'extrémité t' en communication avec un tube à chaux sodée de manière à ne faire en-

trer dans l'appareil que de l'air privé d'anhydride carbonique.

Il faut maintenant doser l'acide carbonique absorbé par la potasse de la boule B.

3° *Dosage de l'acide carbonique provenant de l'oxydation du carbone.*

La méthode que j'ai employée est la méthode alcalimétrique dont voici tout d'abord en bref la suite des opérations : précipitation de la solution alcaline par le chlorure de baryum, lavage du précipité par décantation et centrifugation, reprise par un excès d'acide chlorhydrique N/20 et titrage en retour par la potasse N/20.

Voici en détails comment il convient d'opérer :

a) Précipitation de l'acide carbonique de la solution alcaline à l'état de carbonate de baryte. — Le tube à boule t B t' est retiré du bouchon de caoutchouc et placé à peu près horizontalement. Avec une pissette on introduit de l'eau distillée dans la partie t du tube t B t', mais sans la faire passer dans la boule, on s'en débarrasse ensuite totalement en redressant le tube; on recommence une seconde fois. Cette opération permet d'éliminer les très petites quantités d'acide sulfurique qui ont pu parvenir sous forme de vapeurs jusqu'en t et s'y condenser.

Le tube t B t' est alors renversé, son extrémité t' étant engagée dans un tube de centrifugeur à extrémité conique qui fait partie du petit centrifugeur à main d'un modèle très connu employé couramment dans les laboratoires d'urologie en particulier. La solution potassique s'écoule, quitte la boule et pénètre dans le tube du centrifugeur. Sans rien changer à la position renversée du tube t B t', on adapte à la partie t un tube de caoutchouc en communication avec un récipient d'eau distillée légèrement surélevé dans lequel n'entre que de l'air dépouillé d'anhydride carbonique (tube de garde à chaux sodée à la partie supérieure). On remarquera combien le lavage est efficace, si l'on s'arrange de façon que la partie étirée du tube t, qui pénètre dans la boule B, regarde en haut : l'eau de lavage douche la paroi opposée et se répand sur toute la surface de la boule pour se réunir finalement dans le tube t' et

l'abandonner. Ayant lavé une première fois avec 2 ou 3 cc., on répète cette opération deux fois encore et le tube du centrifugeur se trouve ainsi rempli à deux ou trois centimètres du bord. On le bouche avec un bouchon de liège ne fermant pas hermétiquement.

On le plonge alors sans l'agiter (la solution alcaline plus dense reste au fond), dans un bain-marie d'eau bouillante, et on attend trois minutes. D'autre part, on fait bouillir 2 cc. à 2 cc. 5 d'une solution de chlorure de baryum à 10 % du sel cristallisé. On retire le tube du bain-marie, on le maintient vertical dans un support approprié (un bloc de bois troué convient parfaitement) et avec un agitateur en verre on rend homogène le contenu. On observe un petit dégagement gazeux, oxygène ou azote, vraisemblablement plus soluble dans la solution alcaline que dans l'eau et dont on ne tient aucun compte. La dissolution aqueuse de chlorure de baryum, très chaude, que l'on reporte un instant encore à l'ébullition, est alors versée dans le tube, on agite le tout avec l'agitateur qui était resté dans le tube, on le retire en lavant la surface avec un jet de micro-pissette, on bouche le tube comme précédemment et on attend une minute. La précipitation quasi immédiate est suivie d'un début de sédimentation du carbonate de baryte et le liquide de la partie supérieure du tube s'éclaircit, mais en même temps un peu de précipité grimpe le long de la paroi jusqu'au bord du tube par adhérence ; on s'en débarrasse par quelques gouttes d'alcool versées le long de la paroi. On rebouche le tube.

b) Centrifugation et lavage du précipité. — On place le tube dans le centrifugeur et on centrifuge pendant 40 à 45 secondes. Le carbonate de baryte, très dense, est littéralement bloqué au fond du tube et on peut sans la moindre crainte de perte se débarrasser du liquide par simple renversement du tube ; un peu de papier à filtre mis en contact avec le bord du tube, une fois le liquide écoulé, permet d'en éliminer la dernière goutte. On remplit alors le tube soit avec de l'eau bouillante, soit avec de l'eau très chaude, légèrement ammoniacale (XX gouttes d'une solution d'ammoniaque à 10 % pour 500 cc.

d'eau distillée), contenue dans une pissette placée à demeure sur un bain-marie bouillant. Avec un agitateur, on remet soigneusement le carbonate de baryte en suspension ; ceci fait, on lave l'agitateur à l'eau distillée, on verse quelques gouttes d'alcool le long de la paroi pour faire disparaître le carbonate de baryte qui tend à nouveau à grimper et on centrifuge une seconde fois pendant 30 secondes. On décante comme précédemment et, de nouveau, on remet le précipité en suspension, non plus dans l'eau ammoniacale ou l'eau chaude, mais dans de l'eau distillée froide. On centrifuge enfin une troisième et dernière fois pendant 30 secondes et on décante l'eau de lavage également pour la dernière fois.

c) Dissolution du carbonate de baryte et titrage en retour. — On mesure alors très exactement, avec une pipette qui sera toujours la même, 10 cc. d'acide chlorhydrique N/20, on les fait écouler dans le tube du centrifugeur et, avec un agitateur, on remet en suspension le carbonate de baryte qui ne tarde à se dissoudre entièrement; on peut aider cette dissolution, si le précipité est abondant, par l'immersion du tube pendant quelques instants dans un bain-marie bouillant. La dissolution terminée, le liquide étant resté rouge, on fait passer quantitativement le contenu du tube dans un petit Erlenmeyer de 50-75 cc. en pyrex, verre neutre ou quartz et on porte le liquide à l'ébullition. On fait alors tomber de la burette la solution exactement titrée de potasse N/20 colorée jusqu'au jaune serin franc. L'opération est terminée, elle a duré 30 minutes environ, 40 minutes au maximum.

4° Calcul de la quantité de carbone.

Le calcul de la quantité de carbone s'établit comme suit :

Soit N le nombre de centimètres cubes de potasse N/20 qui correspond aux 10 cc. d'acide chlorhydrique N/20, n le nombre de centimètres cubes de potasse correspondant à l'excès d'acide chlorhydrique. On aura évidemment :

HCl N/20 consommé correspondant au carbonate de baryte

$$= N - n.$$

Remarquons que l'acide carbonique est bivalent, que sa solution normale renfermerait une demi-molécule, que la quantité de carbone qui lui correspondrait serait par conséquent de 6 gr. par litre, soit 6 mmgr. par centimètre cube. Dès lors, chaque centimètre cube de solution d'acide chlorhydrique N/20 consommé, pour neutraliser le carbone de baryte correspond à :

$$\frac{6 \text{ mgr.}}{20} = 0 \text{ mgr. } 3 \text{ de carbone.}$$

On aura donc :

$$\begin{aligned} &\text{Carbone en mmgr. contenu dans la prise d'essai} \\ &= (N - n) \times 0,3. \end{aligned}$$

L'air contient de l'anhydride carbonique et les réactifs peuvent contenir du carbone.

Nous avons donc fait un dosage à blanc et avons obtenu un léger précipité de carbonate de baryum mesurable et correspondant à 0 cc. 4 d'acide chlorhydrique N/20 consommé.

Puisque les réactifs préparés au début de notre travail nous ont servi pour tous nos dosages de carbone, la relation donnée par NICLOUX (M.) est devenue pour nous en tenant compte de cette correction :

$$\begin{aligned} &\text{Carbone en mmgr contenu dans la prise d'essai} \\ &= [(N - n) - 0,4] \times 0,3. \end{aligned}$$

3° DOSAGE DU PHOSPHORE TOTAL, DU PHOSPHORE ORGANIQUE ET DU PHOSPHORE MINERAL

Nous avons procédé à la détermination du phosphore total, d'une part sur les solutions à examiner, d'autre part sur ces mêmes solutions dans lesquelles nous avons éliminé, au préalable, les phosphates minéraux par précipitation à l'état de phosphates ammoniacaux-magnésiens. Nous obtenons ainsi les quantités de phosphore total et de phosphore organique contenues dans nos eaux peptonées et, par différence entre ces deux résultats, nous déduisons la quantité de phosphore minéral existant dans nos milieux.

a) *Dosage du phosphore total.*

Nous avons dosé le phosphore total en utilisant la méthode

de H. COPAUX (14), modifié par Mme H. HINGLAIS (28, 29), en vue de son utilisation pour le dosage de petites quantités de phosphore.

Le principe de la méthode est le suivant : Quand on traite une solution de phosphate additionnée d'un acide minéral par du molybdate de sodium en présence d'éther, on obtient un complexe liquide de couleur jaune résultant de l'union à l'eau et à l'éther de l'acide phospho-molybdique formé. Ce complexe est facilement séparé par centrifugation et présente l'avantage d'occuper un assez grand volume pour une très petite quantité de phosphore (0 mmgr. 436 de phosphore occupe ainsi 1/20 de cc.).

L'exécution du dosage comportera d'abord la destruction de la matière organique et la minéralisation du phosphore, puis la formation du complexe et la mesure de son volume.

Destruction de la matière organique

Nous avons employé la méthode sulfo-nitrique.

On prélève 50 cc. de milieu qu'on place dans un matras de KJELDAHL de 300 cc., on évapore en chauffant doucement et en agitant sans cesse, vers la fin de l'opération, jusqu'à ce que le volume du liquide ne soit plus que de 1 ou de 2 cc. Après refroidissement on ajoute 10 cc. d'acide nitrique pur, on couvre le ballon et on laisse reposer 24 heures. Ce temps écoulé, on verse dans le matras 2 cc. d'acide sulfurique pur et on procède à la destruction sulfo-nitrique.

On incline le matras et on chauffe doucement, il se dégage d'abord des vapeurs nitreuses, puis le liquide se décolore et des vapeurs blanches apparaissent ; à ce moment, et sans interrompre le chauffage, on ajoute 3 à 5 cc. d'acide nitrique en les faisant glisser goutte à goutte le long du col du matras afin d'éviter les projections. Au moment de l'apparition des vapeurs blanches, on observe souvent en même temps un brunissement de la masse. On continue le chauffage et, quand réapparaissent les fumées blanches, on recommence les additions d'acide nitrique et on renouvelle l'opération jusqu'à ce que le mélange soit complètement décoloré. La destruction

nécessite en général 3 ou 4 additions d'acide azotique ; après la dernière, on continue le chauffage pendant une quinzaine de minutes, afin d'éliminer la plus grande partie de l'acide nitrique, puis on laisse refroidir. On ajoute ensuite environ 10 cc. d'eau distillée, et on porte à l'ébullition pour chasser les dernières traces d'acide nitrique, et rester en milieu sulfurique.

La destruction dure de 3 à 5 heures et si on prend les précautions indiquées on n'observe aucune perte de phosphore.

Le contenu du matras est repris par l'eau distillée et le volume total est amené à 20 ou 50 cc. Il est préférable pour la commodité du dosage, que 10 cc. de la solution ainsi obtenue contiennent de 1 à 2 mmgr. de phosphore.

Dosage du phosphore

On utilise pour le dosage du phosphore une ampoule graduée en $1/80$ de centimètre cube semblable à celle employée par H. COPAUX. La partie principale est renflée comme une ampoule à décantation, et la partie inférieure cylindrique et fermée à son extrémité porte des graduations.

Le volume du complexe n'étant pas tout à fait proportionnel à la quantité du phosphore qu'il contient, il est nécessaire de graduer d'abord l'ampoule en partant d'une solution titrée de phosphate.

Les réactifs employés sont les suivants :

1° Une solution de phosphate mono-ammoniacal (1 cc. renferme 1 mmgr. de phosphore) ;

2° Une solution de molybdate de sodium à 140 gr. 0/00 ;

3° Une solution d'acide sulfurique à 200 gr. 0/00 ;

4° De l'éther exempt d'alcool.

Pour opérer la graduation, on introduit dans l'ampoule dans l'ordre indiqué :

10 cc. de la solution étalon de phosphate convenablement diluée ;

10 cc. de solution sulfurique ;

10 cc. d'éther.

On agite en obturant avec le pouce, puis on ajoute, par portions de 3 cc. et en agitant chaque fois :

10 cc. de solution de molybdate de sodium.

On centrifuge à peu près une minute et on détermine le volume du complexe qui s'est rassemblé à la partie inférieure de l'ampoule.

Si nous avons opéré avec la solution étalon de phosphate diluée à 1/10, nous avons ainsi la graduation correspondant à 1 mmgr. de phosphore. On opérera de même pour des quantités de phosphore allant de 2/10 de mmgr. à 3 mmgr., et on fera les dosages de 2/10 de mmgr. en 2/10 de mmgr.

Le dosage du phosphore dans le produit de la destruction sulfo-nitrique est conduit de la même façon.

On opère toujours sur 10 cc. de solution mais, dans le cas où le contenu du matras de KJELDAHL n'a été repris que par une quantité d'eau suffisante pour obtenir 20 cc., on aura avantage à diluer au demi la solution sulfurique pour éviter d'introduire un excès de cet acide.

Exemple numérique

Dans l'eau peptonée préparée avec la peptone pancréatique de caséine N° 5, nous avons effectué la destruction sur 50 cc., après quoi nous avons ramené au volume initial et le titrage a été fait sur 10 cc. de cette solution.

Après centrifugation, nous avons obtenu un complexe occupant 10,5 divisions (chiffre obtenu dans 3 essais portant sur les produits de 3 destructions différentes) ; nous savons que 9,9 divisions donnent 1 mmgr. 2 de phosphore et que 11,6 divisions correspondent à 1 mmgr. 4 de phosphore.

Nous aurons donc pour la prise d'essai : 1 mmgr. 2 de phosphore plus les 6/17 de 0 mmgr. 2 (puisque pour une différence de 2/10 de mmgr., il y a une différence de graduation de 17/10 de division).

La quantité de phosphore contenue dans la prise d'essai

$$= 1 \text{ mmgr. } 2 + \frac{0,2 \times 6}{17}, \text{ soit } 1 \text{ mmgr. } 27 \text{ pour } 10 \text{ cc., ou}$$

0 gr. 127 par litre.

b) *Dosage du phosphore organique.*

Le dosage du phosphore organique est précédé de l'élimination des phosphates minéraux, à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien, en utilisant pour cela la technique mise au point par M. P. FLEURY et Z. SUTU (17) pour le dosage du phosphore organique urinaire. Le mode opératoire est le suivant :

On prélève 50 cc. de solution de peptone qu'on acidifie légèrement par quelques gouttes d'acide chlorhydrique. On les place dans un vase à précipitation chaude de 200 cc., on ajoute 2 gr. de chlorure d'ammonium et 2 cc. 5 d'une solution concentrée d'azotate de magnésium :

(1 cc. = 0 gr. 50 (No³)² Mg. 6 H² O) ;

on porte le mélange au voisinage de l'ébullition et, à l'aide d'une burette graduée, on y laisse tomber goutte à goutte une solution étendue d'ammoniaque (5 cc. de solution officinale d'ammoniaque pour 195 cc. d'eau distillée) jusqu'à odeur ammoniacale nette.

L'addition d'ammoniaque doit donner naissance à un précipité immédiatement cristallin ; si, au début de l'opération, on observe la formation d'un trouble laiteux, on fait disparaître celui-ci par addition de quelques gouttes d'acide chlorhydrique et on en recommencera l'opération. Pendant l'addition d'ammoniaque on agite le mélange avec une baguette de verre en ayant soin de ne pas toucher les parois du récipient.

L'opération terminée on retire du feu, on laisse refroidir et on ajoute 7 cc. 5 de solution officinale d'ammoniaque. On filtre au bout de 10 minutes. Le filtrat est recueilli dans une fiole jaugée de 100 cc. et on complète au volume avec une solution étendue d'ammoniaque (1 cc. d'ammoniaque officinale pour 100 cc. d'eau) qui servira en même temps à laver le filtre.

Sur le liquide ainsi obtenu on procède au dosage du phosphore total en opérant comme précédemment : destruction sulfo-nitrique, formation du complexe et mesure de son volume. Le résultat trouvé nous indiquera la quantité de phosphore organique contenu dans la prise d'essai.

c) *Dosage du phosphore minéral.*

Le phosphore minéral est obtenu en faisant la différence entre les chiffres trouvés pour le phosphore total et pour le phosphore organique.

4° DOSAGE DES CHLORURES

Nous avons employé la méthode cyano-argentimétrique de DENIGÈS déjà utilisée par H. HINGLAIS (27) pour le dosage du chlore dans les végétaux. Nous pourrions ainsi doser avec précision de petites quantités de chlorures alors que les méthodes de MOHR ou de CHARPENTIER-VOLHARD ne nous le permettaient pas. Le principe de notre méthode étant connu nous n'en indiquerons que la technique.

Suivant les milieux on prélève de 20 à 50 cc. de solution de peptone qu'on verse dans un ballon jaugé de 100 cc. ; on ajoute 2 à 3 cc. d'acide nitrique et une quantité de solution de nitrate d'argent N/50 variable (de 10 à 40 cc.) suivant la proportion de chlorures contenus dans la prise d'essai. On complète à 100 cc. On filtre sur un filtre plissé sans cendres. On recueille 50 cc. de filtrat, qui correspondent à la moitié de la prise d'essai et à la moitié de la quantité de nitrate d'argent N/50 employé, et on les place dans un vase à précipitation. On ajoute un excès d'ammoniaque (à peu près 15 cc.), une quantité de solution de cyanure de potassium N/50 correspondant à la moitié de ce que nous aurons mis de nitrate d'argent et un peu de solution d'iodure de potassium à 10 %. On titre au nitrate d'argent N/50 jusqu'à l'apparition d'un louche. Soit N le nombre de centimètres cubes de nitrate d'argent employés.

La quantité de chlorures entrant dans la prise d'essai est donnée en NaCl par la formule :

$$\text{Chlorures (en NaCl)} = N \times 0 \text{ gr. } 00117 \times 2.$$

Il ne reste plus qu'à rapporter au litre.

5° DOSAGE DES SULFATES

Nous utilisons le mode opératoire mis au point par M. CHATRON (12) pour doser les petites quantités de soufre.

Dans cette méthode on précipite les sulfates par une solution de chlorure de benzidine, en présence d'acétone, en opérant à un pH convenable. On hydrolyse le sulfate de benzidine formé et on titre par la soude l'acide mis en liberté.

La solution de chlorhydrate de benzidine est préparée en délayant 4 gr. de benzidine pulvérisée dans 150 gr. d'eau distillée et en ajoutant peu à peu 50 cc. d'acide chlorhydrique normal pour dissoudre le tout. On complète ensuite à 250 cc. avec de l'eau distillée et on filtre. Pour effectuer le dosage on prélève 5 cc. d'eau peptonée et on les amène à un pH voisin de 2,5 à 3. Pour cela, on ajoute 1/10 de cc. d'une solution de bleu de bromophénol, quelques gouttes d'une solution de soude diluée pour provoquer le virage au bleu, si cela est nécessaire, et enfin une petite quantité d'acide chlorhydrique dilué pour arriver juste à la teinte jaune de l'indicateur.

On ajoute alors 8 cc. d'acétone et 2 cc. de la solution de chlorhydrate de benzidine. On agite, les sulfates précipitent et on laisse reposer une dizaine de minutes.

Le précipité recueilli sur un filtre de verre poreux (verre d'Iéna 10 G. 4) est lavé, d'abord 5 fois avec quelques centimètres cubes d'acétone contenant 10 % d'eau, puis une dernière fois avec 4 cc. d'alcool-éther.

On place ensuite le filtre contenant le précipité dans un « bécher » ; on recouvre d'eau distillée bouillante, neutralisée à la soude en présence de phénolphthaléine, on porte à l'ébullition et on fait tomber goutte à goutte de la soude N/50 jusqu'à hydrolyse complète du précipité et virage au rose de la phénolphthaléine. Chaque centimètre cube de soude N/50 correspond à 0 gr. 00032 de soufre.

Dans beaucoup de solutions de peptones les sulfates n'ont pas pu être dosés par cette méthode, le chlorure de benzidine ne produisant qu'un louche à peine appréciable.

Résultats obtenus dans l'examen des diverses peptones

Les résultats que nous avons obtenus sont réunis dans les tableaux suivants : Le premier tableau est réservé aux déter-

minations physiques et aux examens chimiques qualitatifs, le second tableau comporte tous les résultats de nos dosages chimiques. Chaque dosage a toujours été fait au moins en double et les chiffres indiqués représentent la moyenne de deux déterminations. En particulier, nous avons toujours effectué en double, et même en triple, les destructions sulfuriques ou nitro-sulfuriques nécessaires à la détermination de l'azote ou du phosphore total.

Tous les résultats des dosages sont donnés en grammes par litre, chaque litre d'eau peptonée étant obtenu en partant de 10 gr. de peptone.

	pH	Pouvoir rotatoire	Tension superficielle 5 cm ²	Réaction à l'eau de brome	Réaction de la tyrosinase	Cristaux de leucine et tyrosine
<i>Peptones pancréatiques :</i>						
Peptone pancréatique N° 1	7,0	— 60°	gouttes 107	Positive	Positive	Présence leucine et tyrosine
Peptone pancréatique N° 2	7,0	— 45°	109	Positive	Positive	Leucine et tyrosine
Peptone de gélatine N° 3	7,4	— 113°	110	Négative	Négative	Présence leucine.
Peptone de caséine N° 4	7,2		118	Positive	Positive	Présence leucine et tyrosine
Peptone de caséine N° 5	7,0		104,5	Positive	Positive	Leucine et tyrosine
<i>Peptones pepsiques :</i>						
Peptone pepsique N° 6	7,4	— 70°	114	Négative	Négative	Examen négatif
Peptone pepsique N° 7	7,2	— 80°	108,5	Négative	Négative	—
Peptone de fibrine N° 8	7,4	— 40°	115	Négative	Négative	—
Peptone de muqueuse N° 9	7,4	— 33°	110	Négative	Négative	
Peptone de caséine n° 10	7,1		124	Négative	Positive	Présence tyrosine.

	Azote total	Azote amino-ammoniacal	Azote aminé	Az. form. Az. total	Carbone	Carbone Azote	Phosphore total	Phosphore organique	Phosphore minéral	Chlorures (en NaCl)	Sulfates (en S)
	gr.	gr.	gr.		gr.		gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
<i>Peptones pancréatiques :</i>											
Peptone pancréatique N° 1	1,26	0,622	0,606	49	3,24	2,57	0,052	0,016	0,036	0,43	
Peptone pancréatique N° 2	1,10	0,721	0,700	65	4,80	4,36	0,046	0,028	0,018	0,30	
Peptone de gélatine N° 3	1,56	0,127	0,092	8	3,24	2,07	0,026	0,016	0,010	0,092	
Peptone de caséine N° 4	0,985	0,222	0,187	22	3,12	3,13	0,060	0,035	0,025	0,056	
Peptone de caséine N° 5	1,512	0,438	0,361	28	4,67	3,08	0,127	0,013	0,114	0,046	
<i>Peptones pepsiques :</i>											
Peptone pepsique N° 6	1,34	0,247	0,194	18	4,98	3,72	0,040	0,026	0,014	1,06	
Peptone pepsique N° 7	1,44	0,339	0,297	23	4,46	3,09	0,030	0,020	0,010	0,163	
Peptone de fibrine N° 8	1,06	0,155	0,113	14	3,67	3,46	0,072	0,032	0,040	0,438	
Peptone de muqueuse N° 9	1,20	0,212	0,158	17	4,92	4,10	0,022	0,010	0,012	0,125	0,31
Peptone de caséine N° 10	1,162	0,113	0,067	9,7	3,49	3,00	0,084	0,020	0,064	0,757	

Discussion des résultats

L'examen de tous ces résultats nous conduit aux remarques suivantes :

A) MESURES PHYSIQUES.

1° *pH*. — Tous nos milieux, avant la stérilisation, avaient été ajustés à pH 7,0. Nous constatons que le chauffage a provoqué, dans la majorité des cas, une légère alcalinisation des liquides mis en expériences. L'augmentation du pH est en général plus marquée dans le cas des peptones pepsiques que dans le cas de peptones pancréatiques.

2° *Tension superficielle*. — Les solutions de peptones pancréatiques donnent, sauf une exception, de 105 à 110 gouttes pour 5 cc., tandis que dans les mêmes conditions les solutions de peptones pepsiques donnent de 109 à 124 gouttes. Nous vérifions ainsi que les solutions de peptones pancréatiques possèdent en général une tension superficielle plus élevée que les solutions des peptones pepsiques.

3° *Pouvoir rotatoire*. — La coloration de nos milieux ne nous a permis de faire que quelques examens polarimétriques. Les résultats obtenus paraissent tout d'abord difficiles à interpréter. Cependant si nous remarquons que les matières premières utilisées pour la préparation des peptones possédaient des pouvoirs rotatoires fort différents (gélatine — 130°, fibrine — 37°) et si nous comparons simplement les chiffres trouvés pour des peptones de même origine : peptones pancréatiques de viande N^{os} 1 et 2 et peptones pepsiques de viande N^{os} 6 et 7, nous voyons nettement que le pouvoir rotatoire est plus élevé pour les peptones pepsiques que pour les peptones pancréatiques. Nous retrouvons donc là les différences signalées par HARLAY (26) Remarquons simplement que les pouvoirs rotatoires trouvés dans nos essais sont légèrement supérieurs à ceux qui sont indiqués par cet auteur.

B. — EXAMENS CHIMIQUES QUALITATIFS

1° *Réaction de la tyrostatase*. — D'une façon générale, et conformément aux travaux de HARLAY, la réaction de la tyro-

sinase a été positive avec les peptones pancréatiques et négative avec les peptones pepsiques. Nous devons pourtant signaler deux exceptions : la peptone pepsique de caséine donne un résultat positif tandis que la peptone pancréatique de gélatine donne un résultat négatif. Ces constatations ne sauraient nous surprendre. D'une part, la gélatine ne renfermant pas de tyrosine, cet acide aminé ne pourra pas être caractérisé dans les peptones de gélatine ; d'autre part, V. TORBET et H. C. BRODLEY (60) ont montré que, fait exceptionnel, la pepsine en agissant sur la caséine libre très rapidement de la tyrosine. Il est donc normal que nous retrouvions la tyrosine dans les peptones pepsiques de caséine.

2° *Formation de cristaux de leucine et de tyrosine.* — Nous avons mis en évidence dans les solutions de peptones pancréatiques les cristaux de leucine et de tyrosine signalés par M. JAVILLIER (30), tandis que les peptones pepsiques, examinées dans les mêmes conditions, nous fournissaient des résultats négatifs. Nous retrouvons cependant ici les deux exceptions précédentes : d'une part la peptone pancréatique de gélatine présente des cristaux de leucine mais ne montre pas de cristaux de tyrosine, d'autre part la peptone pepsique de caséine renferme des cristaux de tyrosine.

3° *Réaction à l'eau de brome.* — Conformément aux indications du CODEX les réactions à l'eau de brome, négatives avec les solutions de peptones pepsiques sont positives avec les solutions de peptones pancréatiques. Seule la peptone pancréatique de gélatine fournit un résultat négatif car la gélatine ne renferme pas de tryptophane.

C. — EXAMENS CHIMIQUES QUANTITATIFS

Il paraît difficile de tirer des conclusions nettes de l'ensemble des résultats fournis par les dosages chimiques.

Les solutions des différentes peptones renferment des quantités assez comparables d'azote total et de carbone total.

La teneur en azote total reste comprise entre 0 gr. 985 et 1 gr. 560 par litre tandis que la quantité de carbone total varie entre 3 gr. 12 et 4 gr. 98 pour 1000. Les modifications ainsi

observées sont donc de l'ordre de 1 à 1,6 mais les proportions relatives de ces deux éléments varient dans une plus large mesure

puisque le rapport $\frac{C}{N}$ oscille entre 2 et 4,3.

Les résultats obtenus dans les autres déterminations présentent au contraire de légères différences.

L'azote aminé passe, pour les peptones pancréatiques de 0 gr. 092 à 0 gr. 700 pour 1000 (variation de 1 à 7,6) et pour les peptones pepsiques de 0 gr. 066 à 0 gr. 297 (variation de 1 à 4,5). Bien mieux, la peptone pancréatique de gélatine présente une teneur en azote aminé inférieure à celle de la majorité des peptones pepsiques. Cependant, si nous laissons de côté la peptone de gélatine, la gélatine fournissant par hydrolyse acide une proportion relativement faible d'acide aminé, et surtout si nous comparons des peptones de même origine, nous constatons que les peptones pancréatiques sont toujours beaucoup plus riches en azote aminé que les peptones pepsiques correspondantes. Nous voyons en même temps l'importance du mode de préparation et, peut-être aussi, du choix de la matière première utilisée sur la composition des peptones puisque la peptone pancréatique de caséine N° 5 renferme environ 2 fois plus d'azote aminé que la peptone pancréatique de caséine N° 4.

Le taux de l'azote ammoniacal est généralement plus élevé et plus constant pour les peptones pepsiques que pour les peptones pancréatiques sans que nous puissions expliquer cette constatation. On sait que la bactérie peut utiliser aussi bien les sels ammoniacaux que les acides aminés, mais étant donné le faible écart présenté, à ce sujet, par les deux sortes de peptones, il est difficile d'en tirer des conclusions intéressantes.

Le rapport $\frac{\text{Az titrable au formol}}{\text{Az total}}$ doit, d'après M. Javillier

et B. GUÉRITHAULT (31), être supérieur à 20 pour les peptones pancréatiques et inférieur à ce nombre pour les peptones pepsiques. Nos résultats sont généralement conformes aux cons-

tatations faites par ces auteurs. Ne fait exception que la peptone pancréatique de gélatine, dont nous avons déjà signalé la faible teneur en Az aminé et la peptone pepsique de viande N° 7 qui donne un chiffre légèrement supérieur à la limite normalement admise.

La proportion de *phosphore total* contenue dans nos eaux peptonées est fort variable et passe de 0 gr. 022 à 0 gr. 127 par litre, soit une variation de 1 à 5,7 qui porte surtout sur le phosphore minéral. D'une façon générale les peptones pancréatiques sont plus riches en phosphore que les peptones pepsiques de même origine. Les peptones de caséine renferment une forte proportion de cet élément.

Comme il était normal de le supposer la quantité de *chloration de sodium* contenue dans les diverses peptones peut présenter des variations considérables (de 0 gr. 046 à 1 gr. 060 pour mille, soit un rapport de 1 à 23). Les différences ainsi observées ne dépendent pas seulement du mode de préparation puisque les peptones pancréatiques présentent entre elles des variations importantes.

Enfin nous devons noter que si l'on met à part la peptone pepsique N° 9, peptone préparée en milieu acidifié par l'acide sulfurique, la méthode à la benzidine ne nous a pas permis de doser les *sulfates* pouvant exister dans les milieux utilisés.

IV. — Dialyse des solutions de peptones

Les dosages que nous venons d'effectuer nous ont montré que les solutions des diverses peptones présentent des compositions complexes et fort différentes. Les éléments minéraux, en particulier, varient tous dans de très larges proportions. Il était donc indiqué d'essayer de simplifier la constitution de nos liquides de culture afin d'obtenir un milieu naturel, aussi peu complexe que possible, et permettant cependant une bonne croissance microbienne. De plus, en ajoutant à ce

milieu de base des quantités connues de composés chimiques bien déterminés, nous pouvions espérer pouvoir mettre en évidence l'influence exercée par tel ou tel élément sur la multiplication bactérienne.

Les peptones devant surtout servir dans nos essais de source de carbone et d'azote, nous avons cherché à éliminer la majeure partie des sels minéraux présents dans leur solution en soumettant celle-ci à la dialyse. Les techniques d'électro-dialyse n'ayant pas encore été mises au point dans notre laboratoire au moment où nous y travaillions, nous avons eu recours à la dialyse ordinaire en utilisant le mode opératoire suivant :

On dissout la peptone dans une petite quantité d'eau distillée (en principe 30 gr. de peptone pour 200 cm³ d'eau). On porte la solution à l'ébullition et, après avoir maintenu celle-ci pendant 2 à 3 minutes, on filtre. Le liquide refroidi est placé dans un dialyseur de GRAHAM fermé par une membrane de papier parchemin et disposé sur un cristalliseur renfermant de l'eau distillée. L'épaisseur de la solution à dialyser doit être assez faible et les niveaux de cette solution et de l'eau distillée extérieure doivent être aussi voisins que possible. Pour éviter des modifications possibles de la composition des solutions de peptones sous l'influence de fermentations microbiennes ou du développement de moisissures, la dialyse est effectuée à la glacière et l'opération est arrêtée au bout de 48 heures. Au bout de ce temps, l'eau du cristalliseur extérieur, qui a été changée 3 ou 4 fois par 24 heures, ne renferme généralement plus de chlorures décelables par l'azotate d'argent. Dans un seul cas l'addition de ce réactif nous a encore donné, à ce moment, une légère opalescence.

La dialyse terminée, la solution de peptone est additionnée d'eau distillée, de façon à obtenir un litre de milieu par 10 gr. de peptone traitée. On ajuste la réaction à pH 7,0 par addition de soude diluée, on répartit dans des matras de pyrex et on stérilise à 115° pendant 20 minutes. Si ce premier chauffage provoque la formation d'un léger précipité on filtre, on ramène la réaction à pH 7,0 si cela est nécessaire, on recom-

plète au volume initial pour compenser la concentration produite par le chauffage à l'autoclave et on stérilise à nouveau.

Nous avons procédé de la même façon en partant des solutions concentrées de peptones de caséine préparées par nous. Nous avons simplement remplacé les 30 gr. de peptone sèche par la quantité de solution concentrée donnant, par évaporation, 30 grammes d'extrait sec.

Nous avons soumis à la dialyse les 5 peptones suivantes qui nous ont donné des résultats intéressants dans l'étude de la multiplication du bacille pyocyanique :

peptone pancréatique de viande N° 1 ;

peptone pancréatique de caséine N° 5 ;

peptone pepsique de viande N° 6 ;

peptone pepsique de muqueuse N° 9 ;

peptone pepsique de caséine N° 10.

Les dosages effectués, après stérilisation, sur les solutions dialysées correspondant à 10 grammes de peptone initiale pour un litre de milieu, nous ont conduit aux résultats rassemblés dans les deux tableaux suivants : Rappelons que ces résultats correspondent à des peptones dialysées dans des conditions déterminées : papier parchemin (identique pour toutes les peptones), dialyse à basse température, opération arrêtée au bout de 48 heures. Nous donnons également dans ces tableaux les chiffres trouvés pour les solutions des mêmes peptones non dialysées et nous indiquons en outre pour chaque élément les quantités éliminées par la dialyse. Celles-ci sont données en valeur absolue et en fraction des quantités initiales.

Le premier tableau résume les résultats des mesures physiques et des dosages se rapportant aux différentes formes de l'azote. Le deuxième tableau donne les résultats relatifs au carbone et aux principaux éléments minéraux.

	Peptone pancréati- que N° 1	Peptone pancréati- que de caséine N° 5	Peptone pepsique N° 6	Peptone de muqueuse N° 9	Peptone pepsique de caséine N° 10
Avant dialyse.....	7,0	7,0	7,4	7,4	7,1
<i>pH :</i>					
Après dialyse	7,0	7,4	7,3	7,3	7,4
Avant dialyse.....	107	104,5	114	110	124
<i>Tension superficielle :</i>					
Après dialyse	102	103	108,5	105	120
Avant dialyse.....	— 36'	?	— 42'	— 20'	?
<i>Déviation polarimétrique :</i>					
Après dialyse	— 13'	?	— 28'	— 20'	— 52'
Avant dialyse.....	1,26	1,51	1,34	1,20	1,16
Après dialyse	0,868	0,78	0,91	0,67	1,03
<i>Azote total :</i>					
Quantité disparue.....	0,392	0,73	0,43	0,53	0,13
Quantité disparue pour cent...	31,5 %	48,5 %	33 %	44 %	11 %
Avant dialyse	0,622	0,438	0,247	0,212	0,113
Après dialyse	0,098	0,154	0,084	0,084	0,084
<i>Azote amino-ammoniacal :</i>					
Quantité disparue.....	0,524	0,283	0,163	0,128	0,283
Quantité disparue pour cent...	84 %	65 %	70 %	60 %	65 %
Avant dialyse	0,016	0,077	0,053	0,053	0,046
Après dialyse	0,030	0,046	0,014	0,042	0,023
<i>Azote ammoniacal :</i>					
Quantité disparue.....	0,014	0,031	0,039	0,011	0,023
	formé				
Quantité disparue pour cent...	87,5 %	40 %	73,5 %	21 %	50 %
Avant dialyse	0,606	0,361	0,193	0,158	0,067
Après dialyse	0,068	0,108	0,070	0,042	0,061
<i>Azote aminé :</i>					
Quantité disparue.....	0,538	0,253	0,123	0,116	0,006
Quantité disparue pour cent...	89 %	70 %	64 %	73 %	9 %
Avant dialyse	49	28	18	17	9,7
<i>Azote formol :</i>					
<i>Azote total</i>					
Après dialyse	11,5	19	9,5	12,5	8

	Peptone pancréati- que N° 1	Peptone pancréati- que de caséine N° 5	Peptone pepsique N° 6	Peptone de muqueuse N° 9	Peptone pepsique de caséine N° 10
Avant dialyse.....	3,24	4,67	4,98	4,92	3,49
Après dialyse	3,11	2,80	3,49	1,77	3,11
<i>Carbone :</i>					
Quantité disparue	0,13	1,87	1,49	3,15	0,38
Quantité disparue pour cent...	4 %	40 %	30 %	62 %	11 %
Avant dialyse	2,57	3,08	3,72	4,10	3,00
<i>Carbone</i>					
<i>Azote</i>					
Après dialyse	3,58	3,58	3,83	2,64	3,01
Avant dialyse	0,052	0,127	0,040	0,022	0,084
Après dialyse	0,014	0,110	0,017	0,008	0,061
<i>Phosphore total :</i>					
Quantité disparue	0,038	0,017	0,023	0,014	0,023
Quantité disparue pour cent .	73 %	13,5 %	57,5 %	63,5 %	27,5 %
Avant dialyse.....	0,016	0,013	0,026	0,010	0,020
Après dialyse	0,014	0,012	0,017	0,008	0,019
<i>Phosphore organique :</i>					
Quantité disparue	0,002	0,001	0,009	0,002	0,001
Quantité disparue pour cent...	12,5 %	75 %	34,5 %	20 %	5 %
Avant dialyse.....	0,036	0,114	0,014	0,012	0,064
Après dialyse	0	0,098	0	0	0,042
<i>Phosphore minéral :</i>					
Quantité disparue	0,036	0,016	0,014	0,012	0,022
Quantité disparue pour cent...	100 %	14 %	100 %	100 %	34,5 %
Avant dialyse.....	0,435	0,046	1,06	0,125	0,757
Après dialyse	0,247	0,009	0,388	0,074	0,079
<i>Chlorures :</i>					
Quantité disparue	0,188	0,037	0,672	0,051	0,678
Quantité disparue pour cent...	43 %	80,5 %	63,5 %	41 %	89,5 %
Avant dialyse				0,31	
Après dialyse				0,204	
<i>Sulfates :</i>					
Quantité disparue				0,106	
Quantité disparue pour cent...				34 %	

Il paraît difficile de tirer des conclusions nettes de l'ensemble de ces résultats.

Les mesures physiques nous montrent, en général, une diminution de la déviation polarimétrique et une augmentation de la tension superficielle. Ces deux variations sont évidemment en rapport avec la disparition des composés solubles éliminés à la dialyse.

Les dosages chimiques mettent en évidence une diminution nette de tous les éléments étudiés. Dans un seul cas, peptone pancréatique N° 1, l'azote ammoniacal trouvé après dialyse a été plus élevé que pour la peptone originale. Il s'agit probablement là d'une contamination, survenue pendant la dialyse et qui s'est manifestée par la production d'ammoniaque.

Les proportions des différents éléments éliminés par la dialyse sont fort variables et ne présentent généralement pas de caractère commun. Nous devons cependant noter que la peptone pepsique de caséine ne perd pendant cette opération que des quantités relativement faibles de ses principaux éléments: Azote total 11 %, carbone total 11 %, phosphore total 27,5 %, phosphore minéral 34,5 % et surtout azote aminé 9 %. La peptone pancréatique de caséine conserve également, après dialyse, une très forte proportion de son phosphore initial. D'une façon plus générale, nous voyons que les peptones soumises à la dialyse perdent le plus souvent de 30 à 50 % de leur azote total, de 4 à 62 % de leur carbone, de 55 à 70 % de leur phosphore total et pratiquement la totalité de leur phosphore minéral.

Les chlorures sont éliminés dans une proportion qui varie de 40 à 90 %, les pertes d'azote ammoniacal et d'azote aminé sont de l'ordre de 20 à 75 % et de 60 à 90 %. Il en résulte

que le rapport $\frac{\text{Az formol}}{\text{Az total}}$ est toujours moins élevé pour

les peptones dialysées que pour les peptones originelles.

Résumé de ce premier chapitre

Dans ce Chapitre, nous nous sommes efforcé de définir, aussi bien que possible, les diverses peptones que nous désirions utiliser pour l'étude de la multiplication et du métabolisme du bacille pyocyanique.

En nous basant sur les travaux des auteurs précédents, nous avons pu différencier nettement les peptones pepsiques des peptones pancréatiques. Dans ces dernières, l'hydrolyse fermentaire a été plus complète et la quantité d'azote aminé est beaucoup plus forte. Les autres caractères des peptones ne sont que les harmoniques de cette dominante.

L'azote aminé plus élevé dans les peptones pancréatiques que dans les peptones pepsiques appelle un pouvoir rotatoire moins gauche, une tension superficielle plus forte, un rapport

$$\frac{\text{azote formol}}{\text{azote total}} \text{ plus élevé.}$$

Les réactions des acides aminés spécifiques des peptones pancréatiques se sont montrées fidèles au cours de nos essais, en retrouvant toutefois les quelques exceptions déjà signalées.

Mais le but que nous nous proposons demandait des données plus précises. Pour observer les modifications provoquées dans un milieu de culture par la multiplication du bacille pyocyanique encore fallait-il que ce milieu fût préalablement bien connu. C'est pourquoi, poussant plus loin que nos devanciers, nous avons dosé les principaux éléments de nos peptones : carbone, azote total, azote amino-ammoniacal, azote ammoniacal, azote aminé, phosphore sous différentes formes, sulfates, chlorures.

Considérant l'inconstance de la quantité des sels minéraux, nous avons pensé que la dialyse les séparerait peut-être suffisamment de la matière organique. Il nous serait alors loisible d'additionner nos peptones purifiées et en quelque sorte sim-

plifiées, d'une quantité déterminée de composés définis et d'observer l'influence de ceux-ci sur le croît microbien.

Nous avons effectué cette dialyse sur 5 peptones choisies parmi les 10 qui nous ont servi de point de départ. Notre choix était fondé sur une étude bactériologique des peptones et les raisons qui l'ont motivé seront exposées au deuxième chapitre.

Sans nous attendre à la perfection, nous espérons de meilleurs résultats que ceux que nous avons trouvés. Les sels minéraux se sont trouvés éliminés de façon inconstante par suite de phénomènes complexes d'adsorption. D'autre part, nos peptones ont subi une perte considérable en azote aminé et en azote ammoniacal, formes les plus assimilables de l'aliment azoté. Seule l'étude bactériologique nous montrera, pourtant, si cette élimination massive est vraiment préjudiciable à la multiplication microbienne.

CHAPITRE II

DÉTERMINATION DE LA VALEUR BACTÉRIOLOGIQUE DES PEPTONES CHOISIES : PEPTONES ORDINAIRES ET PEPTONES DIALYSÉES

Nous avons cherché, dans notre travail, à constituer un milieu naturel, aussi simple que possible, et permettant cependant une excellente multiplication d'un germe déterminé, en l'espèce le bacille pyocyanique. Nos recherches ont été faites en cultivant ce bacille dans des solutions à 10 p. 1000 de différentes peptones: peptones préparées dans l'industrie ou au laboratoire et peptones dialysées. Dans le chapitre précédent, nous avons défini le plus exactement possible les milieux ainsi obtenus en utilisant un certain nombre de mesures physiques ou chimiques.

Dans ce second chapitre, nous avons essayé de déterminer la « valeur bactériologique » des peptones choisies. La valeur bactériologique d'une peptone sera d'autant plus grande qu'elle permettra un développement microbien plus abondant et plus rapide. Pour arriver à ce résultat, nous avonsensemencé, dans les milieux à étudier, une quantité déterminée de germes, en principe 500.000 bacilles pyocyaniques par centimètre cube, et nous avons suivi la multiplication microbienne dans les liquides ensemencés en dénombrant, à des intervalles déterminés, le nombre des « bacilles visibles » et des bacilles capables de se multiplier sur milieux gélosés, « bacilles dits résistants », présents dans l'unité de volume. En rapprochant les chiffres ainsi obtenus des résultats trouvés dans l'analyse

des eaux peptonées utilisées, nous verrons si la richesse d'une peptone en tel ou tel élément se traduit par une valeur bactériologique plus ou moins élevée.

Enfin, en comparant la composition d'un milieu stérile à celle du même milieu ensemencé, puis débarrassé des corps microbiens au moment du maximum de la multiplication bactérienne, nous mettrons en évidence les modifications produites par la croissance microbienne dans la constitution des liquides de culture.

Après avoir indiqué les techniques utilisées dans nos essais pour la numération des bactéries présentes dans un milieu de culture liquide, et après avoir résumé les principaux travaux relatifs au rythme de la multiplication microbienne, nous aborderons nos recherches personnelles. Nous exposerons successivement les expériences effectuées avec les peptones pancréatiques, avec les peptones pepsiques et avec les peptones dialysées. La comparaison des résultats ainsi obtenus mettra en évidence la « valeur bactériologique » des diverses peptones et nous montrera si cette valeur est en relation simple avec tels ou tels éléments chimiques présents dans les milieux de culture considérés. Enfin les dosages chimiques effectués sur des milieux ensemencés nous indiqueront si l'arrêt de la multiplication microbienne est en rapport avec des modifications importantes de la constitution des milieux de culture.

I. — MÉTHODES DE NUMERATION UTILISÉES POUR SUIVRE QUANTITATIVEMENT LA MULTIPLICATION DU BACILLE PYOCYANIQUE

Nous avons concurremment employé deux méthodes de numération mises au point par J. RÉGNIER et ses élèves. L'une de ces méthodes, consistant en la numération des microbes capables de se multiplier sur plaques de gélose, nous donnait le nombre des microbes considérés comme seuls vivants par les autres auteurs, l'autre méthode, dérivant de la technique

de WRIGHT, nous donnait le nombre total des éléments microbiens visibles : microbes « vivants » et microbes morts.

En fait, on ne connaît pas le nombre des microbes réellement « vivants » présents dans un milieu de culture — mais celui des microbes qui, en l'occurrence, sont capables, après réensemencement, de se multiplier sur un nouveau milieu, ce qui est tout à fait différent. Il semble bien qu'un microbe puisse être susceptible de se reproduire dans le milieu où il est né sans pour cela avoir la faculté de se multiplier en subculture. Nous avons cru pourtant devoir nous adresser à cette première méthode afin de pouvoir comparer nos résultats avec ceux de nos prédécesseurs qui, sauf BARBER et HEHEWERTH (3 et 26), utilisèrent tous les techniques de numération par ensemencement. Nous avons simplement, dans nos essais, remplacé le terme de « microbes vivants », qui nous paraît trop exclusif, par celui de « microbes résistants ».

Enfin, nous avons fait appel, pour deux raisons, à la méthode de WRIGHT modifiée qui donne le nombre total des microbes « visibles ».

1° La méthode des plaques de gélose nous donnait des résultats inférieurs à la réalité quant aux microbes réellement vivants.

2° Les endotoxines et diastases, qui jouent un rôle très important dans la biologie bactérienne, subsistent un certain temps après la mort des microbes ou après la perte de leur pouvoir reproducteur. Il était donc particulièrement intéressant de connaître le nombre total des microbes visibles présents dans un milieu déterminé.

L'historique et tous les détails techniques de ces deux méthodes de numération ont été donnés en détail, pour la première, par J. RÉGNIER et Mlle S. LAMBIN (51-52), et pour la seconde par J. RÉGNIER et L. NEIPP (53, 54, 55). Nous indiquons simplement le mode opératoire suivi pour chacune d'elles.

1° Numération des microbes dits « résistants » par la méthode des plaques de gélose

PRINCIPE. — On dilue tout d'abord en proportions convenables une quantité connue de culture microbienne. On mélange une quantité déterminée de cette dilution avec une petite quantité de bouillon gélosé amené à liquéfaction. On étale au fond d'une boîte de Pétri le bouillon gélosé ainsi semencé. Ce milieu se solidifie par refroidissement. On compte après un séjour convenable à l'étuve à 37°, le nombre des colonies développées et on admet que chaque colonie correspond à un germe initial.

TECHNIQUE

A. — *Préparation du matériel nécessaire.*

a) **Bouillon à l'extrait de viande Liebig gélosé à 30 0/00.** — La préparation se fait en deux temps:
Préparation du bouillon à l'extrait de viande Liebig.
Préparation du bouillon gélosé.

Préparation du bouillon à l'extrait de viande Liebig.

Prendre :

Extrait de viande Liebig	10 gr.
Peptone bactériologique Byla ..	20 gr.
Eau distillée	1.000 gr.
Chlorure de sodium	5 gr.

Faire dissoudre l'extrait de viande, la peptone, et le chlorure de sodium dans l'eau distillée en chauffant doucement et en agitant constamment. Laisser refroidir et ajuster au pH 7,0 avec de la lessive de soude diluée. Porter à l'autoclave à 120° pendant 15 minutes, filtrer chaud sur filtre préalablement mouillé à l'eau bouillante. Répartir et stériliser à 115° pendant 20 minutes. On a ainsi un liquide jaune-brun, forte-

ment coloré qui est en général limpide, parfois légèrement opalescent.

Préparation du bouillon gélosé.

Prendre 30 gr. de gélose séchée, la couper en petits morceaux et la faire macérer dans l'eau pendant environ 1 heure. Quand la gélose est assez gonflée on l'exprime, et on la place dans un récipient renfermant déjà un litre de bouillon à l'extrait de viande Liebig. On en fait dissoudre la plus grande partie en portant le mélange à 80°-85° et en maintenant cette température pendant une dizaine de minutes tout en agitant continuellement. On ramène ensuite au pH 7,0 si besoin est, puis on porte à l'autoclave à 120° pendant 45 minutes pour achever de dissoudre la gélose. On filtre en sortant de l'autoclave sur un filtre Chardin mouillé auparavant à l'eau bouillante. La filtration est plus rapide si on l'effectue dans l'autoclave chaud. On vérifie le pH et on le ramène encore à 7,0 s'il est nécessaire.

On répartit ce milieu en tubes de 16 mm. de diamètre à raison de 13 cm³ par tube, quantité nécessaire pour recouvrir le fond d'une boîte de Pétri d'une couche de gélose de quelques millimètres d'épaisseur. On stérilise ensuite pendant 20 minutes à 115°.

b) Sérum physiologique à 8 0/00. — Solution de chlorure de sodium à 8 grammes pour 1000 répartie dans des tubes à essais en pyrex de 18 mm. de diamètre à raison de 9 cm³ par tube, et dans des fioles coniques de 250 cm³, également en pyrex, à raison de 100 cm³ par fiole. Dans chaque récipient on met des billes de verre en quantité suffisante pour faciliter l'agitation et on stérilise à 115° pendant 20 minutes.

c) Boîtes de Pétri et pipettes graduées stérilisées.

B. — Dilution du milieu de culture primitif.

On procède par dilutions successives en réglant celles-ci de telle sorte que 1 cm³ de la dernière dilution fournisse sur

bouillon gélosé étalé en boîte de Pétri un nombre de colonies compris entre 10 et 500 à 600. Nos limites sont ainsi assez larges et en faisant un essai préalable il sera assez facile de déterminer le taux des dilutions.

On rend d'abord homogène le milieu de culture à examiner par agitations répétées en présence de billes de verre. Avec une pipette stérile on prélève 1 cm^3 de ce liquide qu'on verse dans une fiole contenant 100 cm^3 de sérum physiologique, on agite vivement, on a ainsi une dilution à $1/100^{\circ}$ du liquide à examiner. Si on prélève 1 cm^3 de cette première dilution et qu'on le porte dans une seconde fiole renfermant également 100 cm^3 d'eau salée, on aura une dilution au $1/10.000^{\circ}$, puis au $1/1.000.000^{\circ}$ et au $1/100.000.000^{\circ}$ si on recommence une troisième puis une quatrième opération. La première dilution peut s'effectuer parfois dans un tube de 9 cm^3 de sérum ; dans ce cas, nous aurons des dilutions au $1/10^{\circ}$, puis $1/1.000^{\circ}$, $1/100.000^{\circ}$ et $1/10.000.000^{\circ}$.

Nous choisissons le procédé qui nous paraît le plus convenable pour obtenir la dilution désirée.

C. — *Ensemencement sur bouillon gélosé et étalement en boîte de Pétri.*

En possession de notre dernière dilution, nous en prélevons après agitation 1 cm^3 que nous portons dans un tube de gélose liquéfiée et maintenue à 46° . On roule le tube rapidement entre les mains afin d'en rendre le contenu homogène et on coule rapidement en boîte de Pétri. On recommence la même opération avec deux autres tubes. Après refroidissement, on enveloppe les trois boîtes de Pétri dans une feuille de papier stérile et on les porte à l'étuve à 37° en ayant soin de disposer les couvercles en dessous, pour éviter la condensation de la vapeur d'eau.

D. — *Numération des colonies développées.*

Les colonies développées sur la gélose sont comptées au bout de 3 jours de séjour à l'étuve. Nous avons observé qu'à ce moment leur nombre n'augmente plus, et que les colonies développées à l'intérieur de la gélose présentent une taille suffisante pour pouvoir les dénombrer très facilement.

Pour faire la numération on pourra diviser la surface de chaque boîte en un certain nombre de secteurs à l'aide de traits à l'encre, compter les colonies dans chacun de ces espaces, et en faire la somme. En faisant la moyenne des résultats obtenus et en multipliant par le titre de la dilution utilisée on obtiendra le nombre de microbes « résistants » contenus dans 1 cm³ de liquide à examiner.

2° Numération des microbes visibles
(« microbes vivants » et « microbes morts »)
par la méthode de numération microscopique
comparative

PRINCIPE.

On fait un mélange en proportions connues de l'émulsion bactérienne à examiner et d'une émulsion de cellules de levure titrée auparavant. On fait un étalement sur une surface assez petite. En comptant sur un certain nombre de champs les microbes d'une part et les cellules de levure d'autre part, on en déduit, par une simple règle de trois, le nombre des bactéries.

TECHNIQUE.

J. RÉGNIER et S. LAMBIN (50) utilisèrent dans une première série d'expériences les hématies de lapin comme éléments de comparaison. Avec cette technique il était difficile de diluer fortement le liquide sanguin sans provoquer une coagulation. Aussi reprenant l'idée de FRIES, ces auteurs firent appel aux cellules de levure qui présentent entre autres avantages celui de donner des suspensions de bonne conservation pouvant servir à un assez grand nombre d'essais.

La numération des microbes visibles s'effectue en deux temps :

- a) préparation de la suspension de levure titrée ;
- b) numération des microbes.

A. — *Préparation de l'émulsion de levure titrée.*

Nous employons la levure des boulangers et nous préparons des suspensions contenant de 200 à 250 millions de cellules par centimètre cube.

La levure doit être fraîche. On en prélève un volume égal à 1 ou 2 cm³ que l'on place dans un mortier et qu'on émulsionne petit à petit avec 100 cm³ de sérum physiologique stérile. On verse la suspension dans une fiole conique en pyrex de 250 cm³, on ajoute 3 cm³ de chloroforme pour assurer la conservation du mélange, des billes de verre de façon à couvrir tout le fond du récipient, et on ferme avec un bouchon de liège.

Pour effectuer la numération de cette suspension, on commence par bien l'agiter, de façon à la rendre parfaitement homogène, puis on en prélève 1 cm³ que l'on dilue dans 9 cm³ de sérum physiologique. Le mélange est assuré par agitation avec des billes de verre. C'est sur cette dilution au dixième qu'on effectuera la numération à l'hématimètre de MALASSEZ.

Nous compterons les cellules de quatre rectangles. Ces rectangles représentent chacun 1/100^e de millimètre cube et sont eux-mêmes divisés en 20 petits carrés. Le jour suivant nous renouvellerons la même opération. Nous ferons une moyenne qui nous donnera le nombre de cellules par rectangle. Ce nombre représentera en millions le nombre de cellules par centimètre cube de suspension. Chaque rectangle en effet correspond à 1/100^e de millimètre cube et la suspension est diluée au dixième.

B. — *Numération des bactéries.*

Le premier soin est de rendre bien homogènes la suspension microbienne et l'émulsion de levures par agitation avec des billes de verre. On prélève alors 1 cm³ de chacune d'elles qu'on introduit dans un même tube à essai stérile contenant 5 ou 6 billes de verre. On agite de façon à bien mélanger.

Sur quatre lames bien dégraissées, lavées successivement avec le mélange sulfo-chromique et l'alcool ammoniacal, on étale le mélange précédent au moyen d'une pipette PASTEUR en

ayant soin de s'arrêter avant la dessiccation complète. On sèche par agitation à l'air et on colore, soit suivant la méthode de TRIBONDEAU, soit tout simplement avec de la fuchsine de ZIEHL. On lave avec précaution pour n'entraîner ni bactéries ni levures.

On compte alors microbes et levures aux endroits où les étalements sont le plus réguliers. On parcourt au moins une cinquantaine de champs, de préférence une centaine et même plus si possible, en répartissant ceux-ci sur l'ensemble des quatre lames. La numération est en général effectuée en une heure.

On fait d'une part la somme des microbes et d'autre part la somme des cellules de levure dénombrées dans tous ces examens.

Soit x la somme des microbes correspondant à y la somme des levures. Sachant que le nombre de levures pour 1 cm³ d'émulsion est représenté par a , nous dirons que si à y levures

correspondant x microbes, à une levure correspondra $\frac{x}{y}$ microbes et à a levures correspondront a fois plus de microbes, soit $\frac{x \times a}{y}$.

Comme a représente le nombre de cellules de levures par centimètre cube, le nombre de microbes correspondant $\frac{x \times a}{y}$ sera aussi le nombre de microbes pour 1 cm³ de l'émulsion employée.

Dans les résultats, nous tiendrons compte de la dilution utilisée. Cette dilution est souvent obligatoire car on ne doit pas avoir une trop grande différence entre le nombre de microbes et celui des cellules de levure.

Dans nos essais, quand nous opérons sur des cultures de 24 heures, nous diluons toujours au dixième l'eau peptonée à examiner avant de la mélanger à la suspension de levure.

II. — DONNÉES ACTUELLEMENT ADMISES SUR L'ÉVOLUTION DU CROIT MICROBIEN

La multiplication bactérienne constitue un phénomène complexe dont le rythme varie au cours des différentes périodes de la culture. Si l'on ensemence dans un milieu de culture convenable des bactéries provenant d'une souche âgée, par exemple de 24 heures, et si l'on suit la multiplication microbienne en dénombrant, à des intervalles convenables, les bactéries présentes dans l'unité de volume de la culture et capables de se reproduire sur bouillon gélatiné ou sur bouillon gélosé, on observe que, dans la généralité des cas, la croissance microbienne s'effectue suivant le rythme suivant :

Pendant un certain temps, il n'y a pas d'accroissement apparent du nombre des microbes, la multiplication commence ensuite et les bactéries se reproduisent, d'abord lentement, puis de plus en plus rapidement, jusqu'à ce que les cellules se divisent avec une vitesse uniforme. Au bout d'un certain nombre d'heures, la multiplication se ralentit et finit par cesser complètement. Le nombre des bactéries vivantes atteint un maximum, s'y maintient pendant un temps assez court puis diminue rapidement. Si on prolonge les numérations on constate que toutes les bactéries finissent par disparaître ou qu'il n'en subsiste qu'un nombre relativement faible.

On peut donc distinguer dans la croissance microbienne différentes phases, qui, d'après les conditions de l'expérience, peuvent être plus ou moins nettes, et que l'on désigne de la façon suivante :

- phase de latence ;
- phase de multiplication logarithmique ;
- phase de multiplication ralentie ;

phase de maximum stationnaire ;
phase de destruction des bactéries.

Ces différentes phases présentent les caractères suivants :

PHASE DE LATENCE

La phase de latence est comprise entre l'ensemencement et le moment où la multiplication des bactéries s'effectue avec une vitesse uniforme et rapide. Pour certains auteurs on observerait même dans la première partie de cette période une diminution du nombre des bactéries capables de se reproduire sur milieux solidifiés. La durée de la phase de latence varie avec la nature des milieux utilisés, la température d'incubation, l'espèce microbienne employée, l'âge des bactéries au moment de l'ensemencement. Dans la pratique courante (bouillon ordinaire, souche de 24 heures, ensemencement de plusieurs milliers de germes, température de 37°), la phase de latence se prolonge pendant deux ou trois heures.

Les nombreuses hypothèses émises pour justifier l'existence de la phase de latence sont toutes discutables.

PHASE DE MULTIPLICATION LOGARITHMIQUE

Pendant cette période, désignée encore sous le nom de phase de multiplication géométrique, la multiplication est géométriquement accélérée et le nombre des bactéries double constamment à intervalles réguliers. Par suite si, sur un graphique, on porte en fonction des temps les logarithmes des nombres des microbes formés, on constate que les divers points obtenus se trouvent sur une ligne droite. Le temps nécessaire pour qu'il y ait formation par simple bipartition des cellules d'un nombre double de microbes est appelé *temps de génération*. Celui-ci reste constant et présente une valeur minimum pendant toute la durée de la phase logarithmique.

La durée de la phase de multiplication logarithmique varie également avec la constitution des milieux de culture, la température et l'espèce microbienne utilisée, mais l'âge de la culture souche, si important quand il s'agissait de la phase de

latence, paraît sans influence sur le rythme de la multiplication géométrique. Dans les conditions habituelles, la phase de multiplication logarithme présente une durée de 5 à 8 heures. Un milieu de culture sera d'autant plus favorable à la croissance d'une bactérie déterminée qu'il permettra une phase de multiplication logarithmique plus longue, caractérisée par un temps de génération le plus petit possible.

PHASE DE MULTIPLICATION RALENTIE

Pendant cette phase, dont la durée est comprise entre 12 et 24 heures, la multiplication, inhibée par les produits du métabolisme bactérien, se ralentit jusqu'à s'arrêter complètement. Les temps de génération croissent continuellement et tendent vers l'infini.

PHASE DE MAXIMUM STATIONNAIRE

Le nombre des bactéries reste sensiblement constant pendant cette phase dont la durée ne dépasse pas, en général, quelques heures. Le nombre maximum des germes ainsi obtenus permet également de juger la valeur d'un milieu de culture et la vitalité de la souche microbienne examinée.

D'après Graham SMITH (57), le nombre maximum des germes formés dépend de la quantité des matières nutritives contenue dans le milieu de culture et de la température d'incubation.

PHASE DE DESTRUCTION DES BACTÉRIES

Le nombre des bactéries décroît d'abord doucement, puis rapidement, et enfin de plus en plus lentement.

III. — ESSAIS PERSONNELS

Après avoir donné les indications relatives au choix du microbe utilisé, à la préparation des milieux de culture et à la marche suivie pour l'étude numérique de la multiplication

microbienne, nous exposerons d'abord en détail les résultats obtenus dans l'étude complète de l'évolution d'une culture microbienne. Nous indiquerons ensuite comment nous avons utilisé et présenté les différents chiffres trouvés dans nos expériences et nous pourrons enfin comparer les résultats obtenus avec les diverses peptones.

1° Microbe utilisé.

Nous nous sommes adressé au bacille pyocyanique, bacille facile à cultiver et dont le métabolisme a été souvent étudié. De plus, cette bactérie mobile ne donne que rarement, en milieu liquide, des amas difficiles à dissocier.

Nous avons utilisé un bacille pyocyanique Pe A, provenant de l'Institut Pasteur et correspondant à la race A, variété pyocyanogène, de GESSARD (19). Cette souche conservée en bouillon gélatiné, au frais et à l'abri de la lumière, était repiquée tous les mois.

Tous nosensemencements ont été effectués à partir de cultures sur gélose âgées de 24 heures et obtenues de la façon suivante : Un tube d'une culture en gélatine est placé à l'étuve à 37° pendant une douzaine d'heures. La gélatine liquéfiée est utilisée pour ensemençer, en stries, un tube de gélose incliné qu'on place pendant 24 heures à l'étuve à 37°. La culture ainsi obtenue servira à ensemençer, le jour même, un nouveau tube de gélose inclinée et c'est cette seconde culture, âgé de 24 heures, que nous utiliserons pour ensemençer nos eaux peptonées. Nous partirons ainsi d'une souche jeune prise en période de pleine multiplication.

2° Milieux employés.

La préparation des eaux peptonées a déjà été indiquée dans le premier chapitre, nous croyons cependant utile de la rappeler ici :

a) *Peptones commerciales.*

On prend :

Peptone	10 grammes
Eau distillée q. s. p.	1.000 cm ³

On fait dissoudre la peptone dans l'eau distillée en chauffant le tout dans une grande capsule et en agitant continuellement. On porte finalement à l'ébullition et on maintient celle-ci pendant 1 minute environ.

Après refroidissement l'eau peptonée est ajustée à pH 7,0 (pH favorable à la multiplication du bacille pyocyanique) par addition de lessive de soude diluée, en utilisant pour cela la méthode colorimétrique et les indicateurs de CLARK et LUBS. On complète ensuite au volume initial (diminué de la quantité utilisée pour l'ajustage de la réaction) par addition d'eau distillée.

L'eau peptonée ainsi obtenue est alors répartie dans des récipients en pyrex de capacité convenable renfermant des billes de verre pour faciliter l'agitation. On stérilise ensuite à l'autoclave pendant 20 minutes à 115°.

En général, l'étude numérique d'une croissance microbienne nécessite 100 cm³ de milieu placés dans une fiole conique de 250 cm³, l'analyse d'un milieu ensemencé exige 600 cm³ d'eau peptonée disposés dans deux matras (400 cm³ dans un matras de 1.000 cm³ et 200 cm³ dans un mortier de 500 cm³).

La plupart des eaux peptonées préparées dans ces conditions sont limpides. Cependant certaines peptones pepsiques (peptone pepsique N° 6, peptone de muqueuse, peptone de fibrine) donnent naissance à un léger dépôt quand on chauffe leurs solutions à l'autoclave. Les milieux troubles ainsi obtenus sont filtrés et leur réaction est vérifiée. On les ramène au volume initial, par addition d'eau distillée pour compenser la concentration produite par le chauffage à l'autoclave, et on les stérilise à nouveau.

b) *Peptones préparées au laboratoire.*

Les eaux peptonées correspondant aux peptones de caséine préparées par nous s'obtiennent très facilement en partant des

solutions concentrées de peptones dont nous avons préalablement déterminé la teneur en extrait sec. On prend :

Solution concentrée de peptone renferment 10 gr.

d'extrait sec 1 dose

Eau distillée, q. s. pour 1.000 cm³

On ajuste la réaction à pH 7,0, on répartit dans des récipients en pyrex contenant toujours des billes de verre et on stérilise pendant 20 minutes à 115°.

c) *Peptones dialysées.*

La préparation des solutions de peptones dialysées a été indiquée au chapitre précédent. Rappelons simplement que les eaux peptonées dialysées s'obtiennent en dialysant pendant 48 heures 10 gr. de peptone ordinaire, en complétant à 1 litre avec de l'eau distillée le liquide resté sur la membrane de papier parchemin, et en stérilisant le milieu ainsi obtenu après avoir ajusté sa réaction à pH 7,0.

3° **Technique utilisée pour l'étude de la multiplication microbienne.**

Tous nos milieux, portés à la température de 37° par un séjour convenable à l'étuve, ont étéensemencés à raison de 500.000 bacilles visibles par centimètre cube. Aussitôt après l'ensemencement on détermine le nombre des bacilles capables de se reproduire sur milieu solidifié par la gélose présents dans 1 cm³ d'eau peptonée, bacilles que nous désignerons plus simplement sous le nom de « bacilles résistants ». Le milieu est ensuite placé à l'étuve à 37° et agité de temps en temps. A des intervalles convenables, correspondants aux différentes périodes de la multiplication microbienne, on détermine, après agitation prolongée et par les méthodes que nous venons d'indiquer, le nombre des bacilles visibles et des bacilles « résistants » présents dans une même prise d'essai. A partir du deuxième jour de la culture, il est bon de capsuler légèrement les flacons pour éviter une concentration par évaporation, l'air intérieur sera renouvelé au moment des agitations.

Chaque expérience est répétée deux fois en utilisant pour cela des eaux peptonées provenant d'un même lot de fabrication. Pour comparer plus exactement la valeur bactériologique de deux peptones différentes, nous avons souventensemencé, en même temps, les deux milieux avec la même émulsion bactérienne afin d'opérer dans des conditions identiques.

4° Etude détaillée de la multiplication du bacille pyocyanique dans la solution de peptone pancréatique N° 1.

Nous disposons d'une culture de bacille pyocyanique sur gélose inclinée âgée de 24 heures et de 100 cm³ d'eau peptonée à 10 0/00 contenus dans une fiole conique en pyrex de 250 cm³ renfermant également de nombreuses billes de verre. On procède aux opérations suivantes :

a) PRÉPARATION ET TITRAGE DE L'ÉMULSION DE LEVURE.

On opère comme nous l'avons indiqué précédemment. Une dilution 1/10 de l'émulsion ainsi préparée examinée à l'hématimètre donne, pour 4 rectangles, dans un premier essai :

$$\begin{array}{r} 179, 185, 203 \text{ et } 227 \text{ cellules, soit en moyenne :} \\ 179+185+203+227 \\ \hline 4 \end{array} = 198 \text{ cellules pour } 1/100 \text{ de mm}^3 \text{ et dans}$$

un second essai :

148, 165, 174 et 298, soit en moyenne 196 cellules pour 1/100 de mm³.

L'émulsion de levure renferme donc 197.000.000 de cellules par centimètre cube.

b) PRÉPARATION ET NUMÉRATION DE L'ÉMULSION MICROBIENNE DESTINÉE A L'ENSEMENCEMENT.

On prélève par râclage de la surface de la culture sur gélose 2 anses de platine de bouillie microbienne. Cette masse mi-

crobienne est soigneusement émulsionnée dans 9 cm³ de sérum physiologique et le mélange est agité longuement, en présence de billes de verre. L'émulsion ainsi préparée renferme ordinairement de 600.000.000 à 1.000.000.000 de germes par centimètre cube. Pour la titrer on en prélève 1 cm³ que l'on agite, dans un tube à essais, avec 1 cm³ d'émulsion de levure. On prélève alors quelques gouttes du mélange qui vont servir à la numération comparative.

Nous trouvons ainsi que pour un total de 331 cellules de levure, nous avons dénombré 1.051 bactéries.

L'émulsion microbienne renfermait donc :

$$\frac{197.000.000 \times 1.051}{331} = 625.000.000 \text{ de bâcilles visibles par cen-}$$

timètre cube.

En général, la préparation et la numération de l'émulsion microbienne nécessitent environ 1 h. 1/2; pendant ce temps la suspension bactérienne est maintenue à l'abri de la lumière. On a avantage à opérer le plus rapidement possible pour éviter l'action nocive exercée sur les bactéries par le sérum physiologique, action mise en évidence par A. DUTHOIT et par WINSLOW et BROOKE (16, 64).

c) ENSEMENCEMENT ET MISE A L'ÉTUVE.

Pour ensemenecer 100 cm³ de milieu à raison de 500.000 bâcilles visibles par centimètre cube, nous devons introduire, dans notre fiole d'eau peptonée, 50.000.000 de bâcilles vis-
bles. Cette quantité est contenue dans $\frac{1 \times 50.000.000}{625.000.000} = 0 \text{ cm}^3 08$

de l'émulsion microbienne. Après avoir longuement agité celle-ci, on en prélèvera donc 0 cm³ 08, qu'on introduira dans nos 100 cm³ d'eau peptonée préalablement portés à 37°. On agite le milieu pour bien répartir les bactéries et avant de le remettre à l'étuve (temps zéro) on en prélève 1 cm³ pour procéder à la numération des bâcilles vivants. Ce premier centimètre cube est versé dans 100 cm³ de sérum physiologique stérile, on agite longuement, et on prélève à nouveau 1 cm³

de cette dilution de bactérie au centième qu'on porte dans une nouvelle fiole conique renfermant également 100 cm³ de solution de chlorure de sodium à 8 0/00. C'est avec 1 cm³ de cette seconde dilution à 1/10.000 qu'on ensemence chacun des trois tubes de gélose fondue avant de les couler en boîte de Pétri. Au bout de 3 jours on procède à la numération des colonies développées sur plaque de gélose. La moyenne des trois nombres trouvés multipliés par 10.000 nous donnera le nombre des bacilles vivants contenus dans 1 cm³ de notre liquide aussitôt après l'ensemencement. Il est à noter que les colonies qui se sont développées à la surface de la gélose présentent des dimensions variables, souvent assez importantes, et une coloration verte, tandis que celles qui ont pris naissance à l'intérieur du milieu solidifié ont un aspect en navette et une coloration noire.

d) PRÉLÈVEMENTS SUCCESSIFS.

Le milieu étant placé à l'étuve à 37°, on en prélève à intervalles convenables 2 fois 1 cm³ pour procéder à la numération d'une part des bacilles visibles, d'autre part des bacilles résistants. Chaque prélèvement est précédé d'une agitation vive et prolongée. Il est nécessaire d'agiter vivement la masse liquide dans tous les sens, une simple agitation circulaire étant souvent insuffisante pour dissocier les voiles bactériens qui tendent à se former. La numération des bacilles visibles s'effectue sur la culture pure pour les premiers prélèvements mais, dès la vingtième heure de la multiplication, il est nécessaire de diluer l'eau peptonée à 1/10 pour obtenir des préparations convenables.

e) RÉSULTATS OBTENUS.

L'exemple choisi nous a fourni les résultats suivants.

I. — *Au moment de l'ensemencement* (temps zéro).

a) bacilles visibles par centimètre cube : 500.000 apportés par l'ensemencement ;

b) bacilles capables de se multiplier sur bouillon gélosé :

Dilution utilisée : 100×100 ;

Nombre de colonies sur boîte de Pétri $9+9+7=25$;

Moyenne de colonies sur boîte de Pétri : 8,33 ;

Bacilles « résistants » par centimètre cube : 83.300.

II. — Culture âgée de 2 heures.

a) Bacilles visibles :

1 cm³ de liquide + 1 cm³ d'émulsion de levure ;

25 bacilles pour 2.325 cellules de levure ;

$$\text{Bacilles visibles par centimètre cube} = \frac{25 \times 197.000.000}{2325} =$$

2.100.000.

b) Bacilles capables de se multiplier sur bouillon gélosé :

Dilution utilisée : 100×100 ;

Nombre de colonies sur boîte de Pétri : $4+10+13=27$;

$$\text{Moyenne de colonies sur boîte de Pétri : } \frac{27}{3} = 9$$

Nombre de bacilles capables de se reproduire par centimètre cube : 90.000.

III. — Culture âgée de 4 heures.

a) Bacilles visibles :

1 cm³ levure + 1 cm³ émulsion microbienne ;

50 bacilles pour 887 levures ;

$$\text{Bacilles visibles par centimètre cube} = \frac{50 \times 197.000.000}{887} =$$

11.100.000

b) Bacilles capables de se multiplier sur bouillon gélosé :

Dilution utilisée : $10 \times 100 \times 100$;

Nombre de colonies sur boîte Pétri $10+12+26=48$;

$$\text{Moyenne de colonies sur boîte de Pétri : } \frac{48}{3} = 16$$

Nombre de bacilles capables de se reproduire par centimètre cube : 1.600.000.

IV. — Culture âgée de 6 h. 15.

Le liquide est très légèrement trouble.

a) Bacilles visibles :

1 cm³ levure + 1 cm³ émulsion microbienne;

112 bacilles pour 1.232 levures;

$$\text{Bacilles visibles par centimètre cube} = \frac{112 \times 197.000.000}{1232} =$$

17.900.000

b) Bacilles capables de se multiplier sur bouillon gélosé :

Dilution : $100 \times 100 \times 100$;

Nombre de colonies sur boîte Pétri : $2 + 1 + 3 = 6$;

$$\text{Moyenne de colonies sur boîte de Pétri : } \frac{6}{3} = 2$$

Bacilles capables de se reproduire par centimètre cube :
2.000.000.

V. — Culture âgée de 9 heures.

Le trouble a un peu augmenté.

a) Bacilles visibles :

1 cm³ levure + 1 cm³ émulsion microbienne.

705 microbes pour 881 levures ;

$$\text{Bacilles visibles par centimètre cube} = \frac{705 \times 197.000.000}{881} =$$

160.000.000

b) Bacilles capables de se multiplier sur bouillon gélosé :

Dilution utilisée : $100 \times 100 \times 100$;

Nombre de colonies sur boîte Pétri $43 + 44 + 45 = 132$;

$$\text{Moyenne de colonies sur boîte de Pétri : } \frac{132}{3} = 44$$

Bacilles capables de se reproduire par centimètre cube :
44.000.000.

VI. — Culture âgée de 20 h. 30 minutes.

Liquide trouble, légèrement fluorescent, présentant un début de voile.

a) Bacilles visibles :

1 cm³ levure + 1 cm³ émulsion microbienne préalablement diluée au 1/10 ;

941 bacilles pour 350 levures ;

$$\text{Bacilles visibles par centimèt. cube} = \frac{941 \times 197.000.000}{350} \times 10 \\ = 5.296.000.000.$$

b) Bacilles capables de se multiplier sur bouillon gélosé :

Dilution utilisée : $100 \times 100 \times 100 \times 100$;

Nombre de colonies sur boîte Pétri : $23 + 21 + 14 = 58$;

$$\text{Moyenne de colonies sur boîte de Pétri : } \frac{58}{3} = 19,33$$

Bacilles capables de se reproduire par centimètre cube :
1.933.000.000.

VII. — Culture âgée de 34 h. 30 minutes.

Liquide très trouble, fortement pigmenté, léger voile.

a) Bacilles visibles :

1 cm³ levure + 1 cm³ de culture dilué au 1/10 ;

168 levures pour 684 microbes.

$$\text{Bacilles visibles par centimèt. cube} = \frac{684 \times 197.000.000}{168} \times 10 \\ = 8.020.000.000.$$

b) Bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée : $100 \times 100 \times 100 \times 100$;

Nombre de colonies sur boîte Pétri : $16 + 16 + 16$;

Moyenne de colonies sur boîte Pétri : 16 ;

Bacilles capables de se reproduire par centimètre cube :
1.600.000.000.

VIII. — Culture âgée de 53 heures.

a) Bacilles visibles :

1 cm³ levure + 1 cm³ de culture au 1/10 ;

516 bactéries pour 186 levures ;

$$\text{Bacilles visibles par centimèt. cube} = \frac{516 \times 197.000.000}{187} \times 10 \\ = 5.464.000.000.$$

b) Bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée : $100 \times 100 \times 100 \times 100$;

Nombre de colonies sur boîte Pétri : $5+5+2=12$;

Moyenne de colonies sur boîte de Pétri : $\frac{12}{3}=4$

Bacilles capables de se reproduire par centimètre cube :
400.000.000.

IX. — *Culture âgée de 3 jours 1 heure.*

La culture est toujours fluorescente.

a) Bacilles visibles :

1 cm³ levure + 1 cm³ émulsion microbienne diluée au 1/10 ;
202 levures pour 336 microbes ;

Bacilles visibles par centimèt. cube = $\frac{336 \times 197.000.000}{202} \times 10$
= 3.276.000.000.

b) Bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée : $100 \times 100 \times 100 \times 100$;

Nombre de colonies sur boîte Pétri : $2+2+2$;

Moyenne de colonies sur boîte Pétri : 2 ;

Bacilles capables de se reproduire par centimètre cube :
200.000.000.

X. — *Culture âgée de 5 jours 2 heures.*

a) Bacilles visibles :

1 cm³ levure + 1 cm³ émulsion bactérienne au 1/10 ;

262 microbes pour 380 levures ;

Bacilles visibles par centimèt. cube = $\frac{262 \times 197.000.000}{380} \times 10$
= 1.358.000.000.

b) Bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée : $100 \times 100 \times 100$;

Nombre de colonies sur boîte Pétri : $60+56+66=182$;

Moyenne de colonies sur boîte de Pétri : $\frac{182}{3}=60,6$

Bacilles capables de se reproduire par centimètre cube :
60.600.000.

XI. — *Culture âgée de 7 jours 23 heures.*

a) Bacilles visibles :

1 cm³ levure + 1 cm³ émulsion bactérienne au 1/10 ;

216 microbes pour 327 levures ;

$$\text{Bacilles visibles par centimèt. cube} = \frac{216 \times 197.000.000}{327} \times 10 \\ = 1.301.000.000.$$

b) Bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée : 100 × 100 ;

Nombre de colonies sur boîte Pétri : 1.020 + 984 + 1.002 ;

$$\text{Moyenne de colonies sur boîte de Pétri : } \frac{3006}{3} = 1002$$

Bacilles capables de se reproduire par centimètre cube :
10.020.000.

XII. — *Culture âgée de 11 jours 6 heures.*

a) Bacilles visibles :

1 cm³ levure + 1 cm³ émulsion bactérienne, 1/10 ;

300 levures pour 135 microbes ;

$$\text{Bacilles visibles par centimèt. cube} = \frac{135 \times 197.000.000}{300} \times 10 \\ = 886.600.000.$$

b) Bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée : 100 × 100 ;

Nombre de colonies sur boîte Pétri : 747 + 621 + 729 = 2.097 ;

$$\text{Moyenne de colonies sur boîte Pétri : } \frac{747 + 621 + 729}{3} =$$

699.

Bacilles capables de se reproduire par centimètre cube :
6.990.000.

5° Résultats obtenus dans l'étude des diverses peptones.

Les résultats obtenus dans l'étude numérique de la multiplication du bacille pyocyannique dans les solutions des différentes peptones étudiées par nous sont rassemblés dans les tableaux et les courbes suivantes :

Un premier tableau donne, pour chaque peptone, le nombre des bacilles visibles et des bacilles résistants dénombrés au cours de prélèvements successifs dans deux ensemencements différents.

Un second tableau indique les moyennes des chiffres trouvés pour les deux ensemencements, les logarithmes de ces nombres et les temps de génération du bacille pyocyannique pendant l'intervalle compris entre deux prélèvements successifs.

Le temps de génération, temps nécessaire à la formation d'une génération bactérienne, se calcule facilement, ainsi que l'ont montré H. BUCKNER, K. LONGARD et G. RIEDLEN (11) en s'appuyant sur le raisonnement suivant :

Soit a le nombre des bactéries présentes dans une culture au temps t , et b le nombre des bactéries, de même catégorie, présentes dans la même culture au temps $t+3$ heures. Le passage du nombre a au nombre b s'est effectué au moyen d'un certain nombre de bipartitions des cellules bactériennes, soit x le nombre de ces bipartitions. Au temps t nous avons a bactéries, après une bipartition le nombre de ces bactéries est devenu égal à $a \times 2$, après 2 bipartitions nous avons $a \times 2 \times 2$ bactéries ou $a \times 2^2$ bactéries, ...après x bipartitions nous devons avoir $a \times 2^x$ bactéries. Or l'expérience nous a donné la valeur de $a \times 2^x$, ce nombre est précisément égal à b .

Nous pouvons donc écrire :

$$a \times 2^x = b \text{ ou } 2^x = \frac{b}{a}$$

par suite $\log. 2^x = \log. b - \log. a$

$$\text{et } x = \frac{\log. b - \log. a}{\log. 2}$$

Comme ces x bipartitions se sont produites en 3 heures ou 180 minutes, nous pouvons dire que la durée moyenne d'une bipartition, pendant la période considérée, s'exprime par la relation :

$$\text{temps de génération } g = \frac{180}{x} \text{ en minutes.}$$

Les chiffres moyens indiqués sur le second tableau nous ont également permis de construire 2 séries de courbes. Celles-ci ont été obtenues en portant en fonction des temps soit les nombres des bacilles visibles et des bacilles « résistants » présents dans la culture, soit les logarithmes de ces nombres.

L'étude comparée des tableaux et des courbes nous permettra de juger la valeur bactériologique de nos diverses peptones. Nous examinerons d'abord les peptones ordinaires puis les peptones dialysées.

Tous les milieux ensemencés ont présenté un léger louche à partir de la quatrième heure après l'ensemencement. Le trouble s'est précisé à partir de la septième ou de la neuvième heure et a augmenté progressivement jusqu'à la trentième heure de la culture. A partir de ce moment, l'opacité des milieux n'a pas varié jusqu'à la fin des essais.

Nous avons observé la formation d'un voile et la production d'une fluorescence verte dans 5 de nos milieux : peptones pancréatiques de viande N^{os} 1 et 2, peptones pepsiques de viande N^{os} 6 et 7 et peptone de muqueuse N^o 3. Le voile apparaît vers la vingt-quatrième heure et se reforme jusqu'au deuxième jour malgré les agitations répétées effectuées au cours des prélèvements. La fluorescence est particulièrement nette entre le premier et le septième jour, puis elle s'atténue progressivement.

Les peptones de caséine, la peptone de fibrine et la peptone de gélatine n'ont présenté ni voile, ni fluorescence verte.

PEPTONE PANCRÉATIQUE N° 1

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉSISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	83.300	153.000
2 heures	2.100.000		90.000	
3 heures		2.110.000		200.000
4 heures	11.100.000		1.600.000	
5 heures 30'..		16.200.000		600.000
6 heures 15'..	17.900.000		2.000.000	
8 heures		19.900.000		4.600.000
9 heures	160.000.000		44.000.000	
20 heures 30'..	5.296.000.000		1.933.000.000	
24 heures 30'..		6.450.000.000		2.700.000.000
34 heures 30'..	8.020.000.000	10.580.000.000	1.600.000.000	1.800.000.000
49 heures		6.441.000.000		1.500.000.000
53 heures	5.464.000.000		400.000.000	
73 heures	3.276.000.000		200.000.000	
4 jours		2.468.000.000		1.200.000.000
5 jours	1.358.000.000		60.600.000	
7 jours		1.523.000.000		10.000.000
8 jours	1.301.000.000		10.020.000	
11 jours	886.000.000	523.000.000	6.990.000	6.200.000

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699	72'	118.150	5,072	517'
2 heures 30'..	2.105.000	6,323		145.000	5,160	
4 heures 45'..				1.100.000	6,041	
7 heures 7'...	18.900.000	7,276	89'	3.300.000	6,518	89'
22 heures 30'..	5.873.000.000	9,769	1200'	2.316.000.000	9,365	97'
34 heures 30'..	9.300.000.000	9,968		1.700.000.000	9,230	
51 heures.....	5.952.000.000	9,765		950.000.000	8,977	
4 jours ½ ...	2.392.500.000	9,379		613.000.000	8,787	
7 jours ½ ...	1.412.000.000	9,150		10.010.000	7,00	
11 jours	704.500.000	8,848		6.595.000	6,819	

PEPTONE PANCRÉATIQUE N° 2

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉSISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	83.000	233.000
2 heures	2.150.000		100.000	
3 heures		2.700.000		313.000
4 heures	12.100.000		1.650.000	
5 heures 30'..				2.900.000
6 heures 15'..	64.300.000		16.300.000	
8 heures		30.100.000		15.600.000
9 heures	104.410.000		55.590.000	
20 heures 30'..	3.128.000.000		1.400.000.000	
24 heures 30'..		6.600.000.000		2.330.000.000
34 heures 30'..	12.709.000.000	13.700.000.000	1.650.000.000	2.930.000.000
49 heures		6.390.000.000		2.930.000.000
53 heures	4.031.000.000		850.000.000	
73 heures	1.901.000.000		466.000.000	
4 jours				2.400.000.000
5 jours	1.165.000.000		120.500.000	
7 jours				41.330.0000
8 jours	1.124.000.000		47.200.000	
11 jours	1.028.000.000		25.670.000	13.350.000

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699	66'	158.150	5,199	394'
2 heures 30'..	2.425.000	6,385		206.000	5,314	
4 heures 45'..			66'	2.275.000	6,357	39'
7 heures 7'...	47.200.000	7,674	138'	15.950.000	7,203	51'
22 heures 30'..	4.864.000.000	9,687		1.865.000.000	9,271	133'
34 heures 30'..	13.205.000.000	10,120		2.290.000.000	9,360	2482'
51 heures	5.210.000.000	9,717		1.890.000.000	9,276	
3 jours ½ ...				1.833.000.000	9,263	

PEPTONE DE GÉLATINE N° 3

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉSISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	410.000	430.000
2 heures	1.950.000		86.000	
3 heures		2.290.000		610.000
7 heures.		14.600.000		12.600.000
7 heures 30'..	10.000.000		8.600.000	
24 heures	1.194.000.000	2.140.000.000	1.100.000.000	1.050.000.000
31 heures	1.750.000.000		1.600.000.000	
32 heures		1.516.000.000		1.100.000.000
48 heures	1.424.000.000	1.092.000.000	900.000.000	800.000.000

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699	75'	420.000	5,623	∞
2 heures 30'..	2.120.000	6,326	112'	348.000	5,541	58'
7 heures 15'..	12.300.000	7,090	141'	10.600.000	7,025	152'
24 heures	1.667.000.000	9,221		1.075.000.000	9,031	1500'
31 heures 30'..	1.633.000.000	9,213		1.350.000.000	9,130	
48 heures	1.238.000.000	9,099		850.000.000	8,929	

PEPTONE DE CASÉINE N° 4

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	360.000	253.000
2 heures		1.760.000		260.000
3 heures	1.700.000		766.000	
4 heures				530.000
5 heures	8.750.000		3.730.000	
6 heures				8.000.000
8 heures	77.500.000		24.300.000	
9 heures		40.560.000		16.600.000
24 heures		1.172.000.000		80.000.000
26 heures	1.737.000.000		60.600.000	
30 heures 30'..		2.937.000.000		860.000.000
38 heures	1.926.000.000		1.200.000.000	
50 heures	8.229.000.000	8.057.000.000	3.900.000.000	3.300.000.000
74 heures	4.032.000.000	3.665.000.000	2.600.000.000	2.400.000.000
5 jours		1.568.000.000		66.000.000
5 jours 14 h. .			164.600.000	
7 jours				61.100.000
8 jours			50.530.000	
10 jours				14.100.000
12 jours			21.526.000	

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699		306.000	5,486	
2 heures 30'..	1.730.000	6,238	84'	513.000	5,710	203'
5 heures	8.750.000	6,942	65'	3.997.000	6,602	51'
8 heures 30'..	59.030.000	7,771	77'	20.450.000	7,311	89'
25 heures	1.454.000.000	9,162	215'	70.300.000	7,847	550'
34 heures 15'..	2.431.000.000	9,386	793'	1.030.000.000	9,013	143'
50 heures	8.143.000.000	9,911	555'	3.600.000.000	9,356	525'
74 heures	3.848.000.000	9,585		2.500.000.000	9,398	
5 jours				115.300.000	8,062	

PEPTONE DE CASÉINE N° 5

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉSISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	330.000	470.000
2 heures	986.000	1.160.000	420.000	486.000
7 heures	13.540.000	20.560.000	9.330.000	12.300.000
22 heures		8.090.000.000		3.600.000.000
24 heures	7.162.000.000		4.333.000.000	
30 heures	3.960.000.000		1.700.000.000	
32 heures		4.142.000.000		2.400.000.000
48 heures	3.924.000.000	2.962.000.000	800.000.000	933.000.000
3 jours			466.000.000	
4 jours 7 h..				14.600.000

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699	109'	400.000	5,602	666'
2 heures	1.073.000	6,030	75'	453.000	5,656	65'
7 heures	17.050.000	7,232	109'	10.810.000	7,034	113'
23 heures	7.626.000.000	9,882		3.996.000.000	9,602	
31 heures	4.051.000.000	9,607		2.050.000.000	9,312	
48 heures	3.443.000.000	9,537		866.000.000	8,938	
3 jours 2/3 ..				240.300.000	8,381	

PEPTONE PEPSIQUE N° 6.

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉSISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	213.000	486.000
2 heures	5.591.000	2.240.000	520.000	620.000
4 heures				2.700.000
5 heures	18.165.000		3.220.000	
6 heures				14.000.000
8 heures	60.460.000	49.020.000	39.000.000	25.600.000
23 heures	4.472.000.000	6.495.000.000	3.900.000.000	3.830.000.000
32 heures	6.889.000.000	8.012.000.000	2.560.000.000	2.800.000.000
48 heures	9.681.000.000	2.638.000.000	2.160.000.000	2.560.000.000
3 jours	1.475.000.000	2.310.000.000	1.030.000.000	1.300.000.000
4 jours		1.470.000.000		868.000.000
5 jours	1.076.000.000		179.600.000	
6 jours		861.000.000		75.300.000
7 jours	698.000.000		47.300.000	
10 jours	351.000.000	230.000.000	22.760.000	35.530.000

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699	53'	349.000	5,543	171'
2 heures	2.415.000	6,383		570.000	5,756	63'
4 heures 30'			62'	2.960.000	6,471	61'
5 heures	18.165.000	7,259	113'			
8 heures	54.740.000	7,738	136'	32.300.000	7,509	130'
23 heures	5.483.000.000	9,739	1227'	3.865.000.000	9,587	
32 heures	7.450.000.000	9,872		2.680.000.000	9,428	
48 heures	2.659.000.000	9,425				
3 jours	1.892.500.000	9,277		1.165.000.000	9,066	
4 jours ½ ..	1.273.000.000	9,105		528.000.000	8,723	
6 jours ½ ..	779.000.000	8,892		61.600.000	7,789	
10 jours	290.500.000	8,463		29.145.000	7,464	

PEPTONE PEPSIQUE N° 7^e

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉSISTANTS	
	1 ^{er} ensementement	2 ^e ensementement	1 ^{er} ensementement	2 ^e ensementement
0.....	500.000	500.000	190.000	490.000
2 heures	1.793.000	2.060.000	236.000	546.000
4 heures				1.400.000
5 heures	16.830.000		1.400.000	
6 heures				10.300.000
8 heures	26.785.000	38.520.000	18.600.000	18.000.000
23 heures	3.359.000.000	4.845.000.000	2.460.000.000	2.060.000.000
32 heures	5.200.000.000	3.253.000.000	1.330.000.000	1.730.000.000
48 heures	2.505.000.000	2.166.000.000	1.230.000.000	1.530.000.000
3 jours			830.000.000	1.100.000.000
4 jours				256.000.000
5 jours			116.600.000	
6 jours				73.300.000
7 jours			43.300.000	
10 jours			38.400.000	30.700.000

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699		340.000	5,531	
2 heures	1.926.000	6,285	61'	391.000	5,592	600'
4 heures 30'..			90'	1.400.000	6,146	81'
8 heures	32.652.000	7,514	130'	18.300.000	7,262	56'
23 heures	4.102.000.000	9,613		2.260.000.000	9,354	130'
32 heures	4.226.000.000	9,625		1.530.000.000	9,185	
48 heures	2.335.000.000	9,369				
3 jours				965.000.000	8,984	

PEPTONE DE FIBRINE N° 8

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉSISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	373.000	263.000
2 heures		1.920.000		413.000
3 heures	1.856.000		720.000	
4 heures				600.000
5 heures	9.720.000		6.630.000	
6 heures				
8 heures	29.760.000		16.000.000	10.000.000
9 heures		46.700.000		24.000.000
24 heures		2.070.000.000		116.000.000
26 heures	1.650.000.000		85.000.000	
30 heures		2.960.000.000		460.000.000
38 heures	1.708.000.000		700.000.000	
50 heures	13.268.000.000	13.720.000.000	5.130.000.000	5.230.000.000
74 heures	15.119.000.000	16.853.000.000	5.500.000.000	6.000.000.000
5 jours	1.817.000.000	1.116.000.000	40.600.000	11.600.000
7 jours				10.600.000
8 jours			10.000.000	
10 jours				460.000
12 jours			40.000	

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699		318.000	5,502	
2 heures 30'..	1.898.000	6,278	79'	566.000	5,753	187'
5 heures	9.720.000	6,998	65'	5.743.000	6,760	44'
8 heures 30'..	38.230.000	7,582	110'	20.000.000	7,301	120'
25 heures	1.860.000.000	9,269	176'	100.500.000	8,002	430'
34 heures	2.334.000.000	9,368	1850'	580.000.000	8,763	222'
50 heures	13.494.000.000	10,130	378'	5.180.000.000	9,714	305'
74 heures	15.986.000.000	10,204	7200'	5.750.000.000	9,760	14400'
5 jours	1.466.000.000	9,166		26.100.000	7,427	

PEPTONE DE MUQUEUSE N° 9

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉSISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	450.000	433.000
2 heures	2.000.000		110.000	
3 heures		2.400.000		496.000
7 heures		34.100.000		24.000.000
7 heures 30'..	21.400.000		11.300.000	
24 heures	7.831.000.000	6.580.000.000	3.100.000.000	1.600.000.000
31 heures	4.026.000.000		2.660.000.000	
32 heures		7.088.000.000		3.530.000.000
48 heures	4.006.000.000	3.317.000.000	2.200.000.000	2.200.000.000

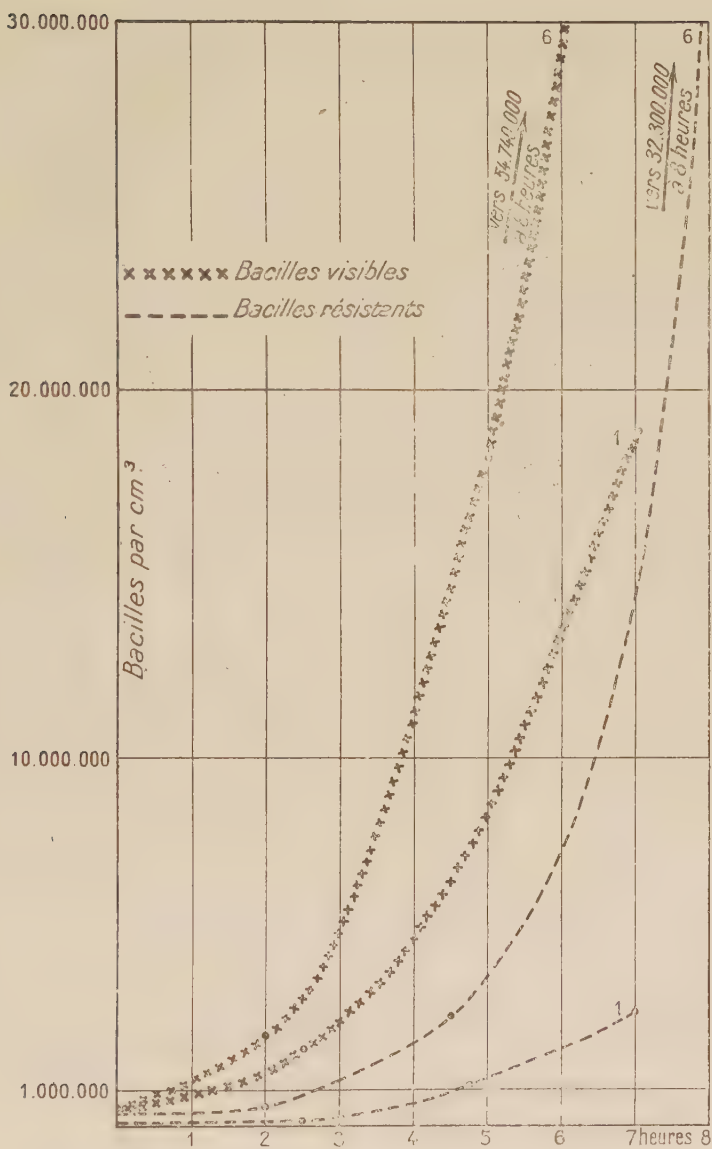
AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699	70' 78' 126'	441.500	5,645	∞
2 heures 30'..	2.200.000	6,342		303.000	5,481	49'
7 heures 15'..	27.750.000	7,443		17.650.000	7,247	144'
24 heures	7.205.000.000	9,858		2.350.000.000	9,371	1153'
31 heures 30'..	5.557.000.000	9,745		3.095.000.000	9,481	
48 heures	3.661.000.000	9,564		2.200.000.000	9,342	

PEPTONE DE CASÉINE N° 10

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉSISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	260.000	373.000
2 heures	1.064.000	1.110.000	323.000	383.000
7 heures	15.640.000	14.140.000	9.230.000	7.600.000
22 heures		5.038.000.000		2.500.000.000
24 heures	6.241.000.000		2.330.000.000	
30 heures	1.410.000.000		1.133.000.000	
32 heures		2.078.000.000		1.430.000.000
48 heures	668.000.000	1.052.000.000	433.000.000	500.000.000
3 jours			300.000.000	
4 jours				6.600.000

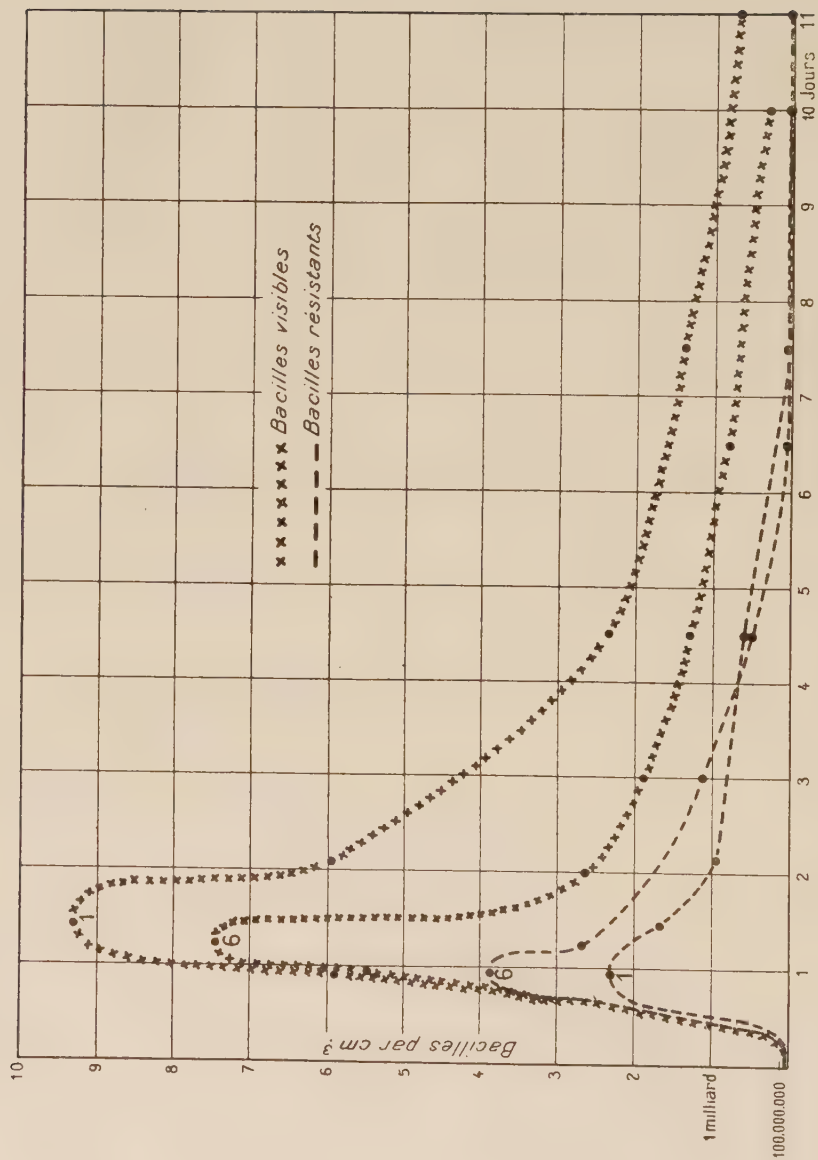
AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699		315.000	5,498	
2 heures	1.087.000	6,036	109'	353.000	5,548	1200'
7 heures	14.890.000	7,173	81'	8.465.000	6,928	65'
23 heures	5.639.000.000	9,751	113'	2.415.000.000	9,383	118'
31 heures	1.744.000.000	9,241		1.280.000.000	9,107	
48 heures	860.000.000	8,934		466.000.000	8,668	
3 jours 1/2 ...				153.300.000	8,185	

Les résultats ainsi obtenus nous montrent que, dans toutes nos solutions de peptones, la multiplication du bacille pyocyanique s'effectue suivant le même rythme. Pour tous nos milieux les courbes représentatives de la croissance microbienne présentent le même aspect général. A titre d'exemple nous donnerons d'abord les courbes relatives aux peptones pancréatiques N° 1 et pepsique N° 6 qui résument particulièrement bien l'allure du phénomène. Les deux premiers graphiques indiquent les variations du nombre des bacilles visibles et du nombre des bacilles résistants en fonction de l'âge de la culture. Pour faciliter la représentation graphique les premières courbes sont réservées aux premières heures qui suivent l'ensemencement, tandis que les secondes comprennent toute la durée de la culture. Les troisièmes courbes, enfin, sont obtenues en portant, en fonction des temps, les logarithmes des nombres trouvés pour les bacilles visibles et pour les bacilles résistants aux différentes époques de la multiplication.

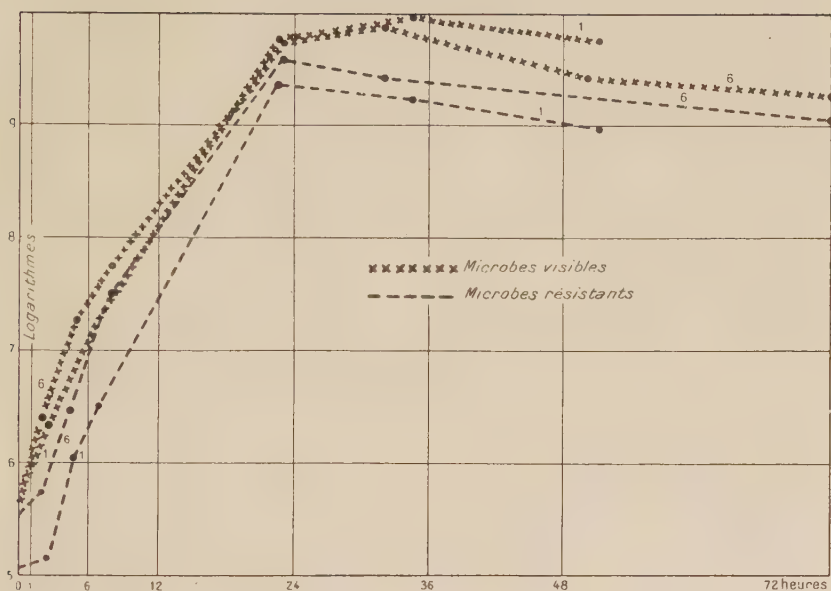


COURBE I. — Multiplication du bacille pyocyaneus avec les peptones pancréatique n° 1 et pepsique n° 6.

Premières heures de la culture.



Courbe II. — Multiplication du bacille pyocyanique
avec les peptones pancréatique n° 1 et pepsique n° 6.
Evolution de la culture.



COURBE III. — Multiplication du bacille pyocyane avec les peptones pancréatique n° 1 et pepsique n° 6.

Variation des logarithmes des nombres de bacilles en fonction de l'âge de la culture.

Les courbes obtenues pour les microbes visibles et pour les microbes capables de se reproduire sur milieu gélosé présentent, au premier abord, le même aspect général. Les germes se divisent d'abord rapidement et les courbes représentatives présentent une inclinaison importante. Après une brève période de croissance rapide, la multiplication se ralentit, la pente des courbes diminue et devient nulle au moment où le nombre des germes formés passe par un maximum. Les nombres trouvés pour les deux catégories de bactéries décroissent ensuite constamment et les courbes se rapprochent de l'axe des x .

Pendant les courbes correspondants aux bacilles visibles et aux bacilles « résistants », présentent entre elles une différence importante.

La multiplication des bacilles visibles commence aussitôt après l'ensemencement. Les temps de génération, relativement faibles pendant les deux ou trois premières heures de la culture, croissent constamment jusqu'à devenir infiniment grands.

Le nombre des bacilles capables de se multiplier sur gélose, au contraire, n'augmente pas, ou très peu, pendant les deux ou trois premières heures de la culture. Nous verrons même que pour certaines peptones, gélatine, muqueuse, on constate parfois, pendant cette période, une diminution du nombre des bacilles « résistants » présents dans la culture. Au bout de cette « phase de latence », la multiplication commence brusquement et nous entrons dans la phase de multiplication logarithmique. Pendant cette période, dont la durée ne dépasse pas quelques heures, les temps de génération sont très faibles, ils augmentent ensuite peu à peu jusqu'à devenir infiniment grands.

Nous voyons donc que lorsqu'on suit la multiplication microbienne en procédant uniquement à la numération microscopique de tous les germes visibles, la phase de latence n'existe pas. Celle-ci n'est mise en évidence que lorsqu'on utilise la méthode de numération des colonies développées sur milieu solidifié, méthode employée exclusivement par les nombreux auteurs qui ont étudié ce phénomène. Nos résultats confirment

les remarques faites par J. RÉGNIER, R. DAVID et A. KAPLAN (15 et 33) et rendent inutiles les différentes hypothèses émises pour expliquer l'existence de la phase de latence. La multiplication bactérienne commence aussitôt après l'ensemencement; les microbes, plongés dans un milieu liquide de composition favorable, se divisent dès les premières heures de la culture, mais cette multiplication, très précoce et rapide, ne donne d'abord naissance qu'à des sujets peu vigoureux, susceptibles de se reproduire dans le bouillon où ils sont nés, mais incapables de résister à un changement de milieu et de se reproduire sur plaques de gélose.

A un même moment de la culture, le nombre des bacilles visibles est toujours supérieur à celui des bacilles résistants. Cette observation déjà faite par HEHEWERTH (26) et WILSON (62) est facilement explicable. En effet, alors que la numération des colonies ne compte que les microbes les plus vigoureux, microbes qui sont capables de se reproduire dans un milieu différent de leur milieu originel, la numération des microbes visibles évalue, non seulement ces germes « résistants », mais encore les germes plus fragiles dont nous venons de parler. En outre, les microbes incapables de toute reproduction, microbes « morts », selon notre définition, restent en suspension dans le liquide et sont comptés comme « microbes visibles » jusqu'à ce que leur lyse se produise.

Pendant la période active de la multiplication, les temps de génération minima trouvés pour les bacilles vivants sont inférieurs aux temps de génération calculés pour les bacilles visibles. Il en résulte que la proportion entre ces deux catégories de microbes varie au cours de la croissance comme cela avait déjà été mis en évidence par J. RÉGNIER, R. DAVID et A. KAPLAN.

Enfin le maximum des microbes visibles se produit soit en même temps, soit une dizaine d'heures après le maximum des microbes résistants. Dans les cas qui nous occupent, ces deux maxima sont séparés par un intervalle d'une dizaine d'heures.

Toutes ces observations sont confirmées par l'examen des courbes logarithmiques. Dans le cas de la peptone pancréati-

que N° 1 et de la peptone pepsique N° 6, par exemple, les courbes correspondant aux bacilles visibles présentent d'abord une pente maximum qui diminue peu à peu et finit par devenir négative. La multiplication des bacilles visibles s'effectue donc de plus en plus lentement depuis l'ensemencement jusqu'à l'obtention du maximum.

Les courbes correspondant aux bacilles résistants, au contraire, présentent d'abord une portion presque horizontale correspondant à la phase de latence puis, brusquement, la phase de multiplication logarithmique se déclare et les courbes présentent une pente maximum qui décroît peu à peu et devient nulle au moment où le nombre maximum des bacilles résistants est atteint dans la culture. Nous pouvons noter en outre que pendant les phases de multiplication logarithmique (de 0 à 7 heures pour les bacilles visibles et de 2 h. 1/2 à 8 heures pour les bacilles résistants), les points correspondant aux différents prélèvements se placent sensiblement en ligne droite.

Valeur bactériologique des diverses peptones

Si la multiplication du bacille pyocyanique s'effectue suivant le même rythme dans les solutions des diverses peptones, il n'en est pas moins vrai que certaines peptones paraissent plus favorables que d'autres à la croissance de ce bacille. On pourrait penser tout d'abord que, suivant le ferment utilisé pour la préparation, on pourrait observer des différences sensibles entre la valeur bactériologique des peptones pancréatiques et celle des peptones pepsiques. En fait, si nous avons pu noter quelques différences entre ces deux variétés de peptones, il semble bien que, *pour le bacille pyocyanique*, la valeur bactériologique d'une peptone dépend plus de la matière première utilisée pour sa préparation que du ferment employé.

Nous avons groupé dans les tableaux suivants les résultats fournis par nos différents essais. Le premier tableau, réservé aux bacilles visibles, donne la valeur du temps de géné-

ration pendant les principales périodes de la multiplication microbienne, l'heure de la culture correspondant à la production du plus grand nombre de germes, la valeur de ce maximum et l'intervalle de temps qui sépare ce maximum de celui des microbes résistants. On y trouvera également le rapport entre le maximum des germes visibles et celui des germes résistants. Le deuxième tableau donne des indications semblables pour les bacilles capables de se reproduire sur gélose. Dans quelques cas, nous avons ajouté le nombre de germes résistants présents dans 1 cm³ de liquide au dixième ou au onzième jour de la culture.

Nous avons distingué dans l'évolution de nos cultures trois périodes principales qui nous paraissent correspondre assez bien à la pratique bactériologique.

La première période dite « période de latence » correspond aux toutes premières heures de la culture. C'est la phase de latence des différents auteurs. Dans nos essais, cette période s'étend depuis l'ensemencement jusqu'à la cent-vingtième ou la cent cinquantième minute.

La période dite de « multiplication logarithmique » correspond à la phase de multiplication rapide des bactéries dites résistantes. Nous lui avons attribué dans nos essais une durée moyenne allant de la deuxième heure à la septième ou huitième heure de la culture.

Enfin la période dite de « multiplication ralentie » s'étend de la huitième heure au moment de la formation du nombre maximum des germes. Nous l'avons divisée en plusieurs phases dont les deux principales vont, l'une de la huitième à la vingt-quatrième heure, et l'autre de la vingt-quatrième à la trente-deuxième ou trente-quatrième heure.

Dans ces tableaux, les peptones sont groupées d'après leur origine, ce qui permet de voir facilement les similitudes ou les différences présentées par les peptones pepsiques et les peptones pancréatiques.

MICROBES VISIBLES

	PEPTONE DE VIANDE						Peptone de mouton			PEPTONE DE CASÉINE			Peptone d'œuf		Peptone de gélatine	
	Pancréatique	Pancréatique	Pepsique	Pepsique	Pancréatique	Pepsique	N° 9	Pancréatique	Pepsique	Pancréatique	Pepsique	N° 8	Pancréatique	Pepsique	Pancréatique	Pepsique
No 1	No 2	No 6	No 7				No 9	No 5	No 10	No 4		No 8			No 3	
72'	66'	53'	61'				70'	109'	109'	84'		79'			75'	
89'	66'	80'	90'				78'	75'	81'	72'		83'			112'	
111'	138'	136'	130'				126'	109'	113'	215'		176'			141'	
1.200'	514'	1.227'	13.500'							793'		1.850'				
34 h. 30'	34 h. 30'	32 h.	32 h.				24 h.	23 h.	23 h.	50 h.		74 h.			24 h.	
9.300	13.200	7.450	4.226				7.205	7.626	5.639	8.143		15.986			1.667	
+12 h.	0	+ 9 h.	+ 9 h.				-7 h. 30	0	0	0		0			0	
4	6	1,9	1,8				2,3	1,9	2,3	2,2		2,8			1,2	
TEMPS DE GÉNÉRATION PENDANT :																
Période dite de latence : (0 à 2 heures ou 2 h. 30')																
Période dite de multiplication logarithmique :																
(2 heures à 7 heures ou 8 h. 30')																
Période de multiplication ralentie :																
a) 8 heures à 24 heures																
b) 24 heures à 32 heures																
c) 34 heures à 50 heures																
d) 50 heures à 74 heures																
HEURE DU MAXIMUM																
VALEUR DU MAXIMUM (en millions)																
Différence avec l'heure du maximum des résistants																
Maximum des visibles																
Maximum des résistants																

MICROBES RÉSISTANTS

	PEPTONE DE VIANDE				Peptone de muqueuse		PEPTONE DE CASÉINE		Peptone de fibrine	Peptone de gélatine
	Pancréa- tique	Pancréa- tique	Pepsique	Pepsique	Pepsique	Pancréa- tique	Pancréa- tique	Pepsique	Pancréa- tique	Pancréa- tique
	N° 1	N° 2	N° 6	N° 7	N° 9	N° 5	N° 10	N° 4	N° 8	N° 3
TEMPS DE GÉNÉRATION PENDANT :										
Période dite de latence (0 à 2 heures ou 2 h. 30')	517'	394'	171'	600'	∞	666'	1200'	203'	187'	∞
Période dite de multiplication logarithmique (2 h. à 7 h. ou 8 h. 30')	61'	44'	62'	62'	49'	65'	65'	68'	70'	56'
Période dite de multiplication ralentie.										
a) 8 h. à 24 h.	97'	133'	130'	130'	144'	113'	118'	550'	430'	152'
b) 24 h. à 32 h.		2.482'			1.153'			143'	222'	1.500'
c) 34 h. à 50 h.								525'	305'	
d) 50 h. à 74 h.									14.400'	
HEURE DU MAXIMUM	22 h. 30'	34 h. 30'	23 h.	23 h.	31 h. 30'	23 h.	23 h.	50 h.	74 h.	31 h. 30'
VALEUR DU MAXIMUM (en millions)	2.316	2.290	3.865	2.260	3.095	3.996	2.415	3.600	5.750	1.350
Nombre de germes résistants au 10 ^e ou 11 ^e jour (en millions)	6,5	19	29	34				18	0,25	

L'examen du premier tableau nous montre nettement que, dans la généralité des cas, le temps de génération des microbes visibles croît constamment depuis l'ensemencement jusqu'au moment où cesse la multiplication. Nous devons noter pourtant deux exceptions à cette règle :

1° Pour les peptones de caséine la multiplication des germes visibles semble un peu plus rapide pendant la période de multiplication logarithmique que pendant la période dite « de latence ».

2° La multiplication des germes visibles dans les solutions de peptone de fibrine s'effectue suivant deux processus successifs. Après avoir augmenté constamment depuis l'ensemencement jusqu'à la trente-quatrième heure les temps de génération diminuent fortement entre la trente-quatrième et la cinquantième heure, puis recommencent à croître et deviennent infiniment grands au moment où le nombre des germes fournis passe par un maximum, c'est-à-dire à la soixante-quatorzième heure. Nous retrouverons le même phénomène, avec encore plus de netteté, quand nous étudierons la multiplication des bacilles dits « résistants ».

Les temps de génération, dans les différentes périodes de la multiplication, sont du même ordre de grandeur pour la plupart des peptones (périodes dite « de latence » 53 à 79', période « logarithmique » 66 à 90', première fraction de la période de multiplication ralentie 109 à 138'). Les temps de génération ne sont supérieurs à la normale que dans trois cas :

a) Pour les peptones de caséine, pendant la période dite « de latence », comme nous l'avons indiqué tout à l'heure.

b) Pour la peptone de gélatine dès la période de multiplication logarithmique.

c) Pour la peptone de caséine N° 4 et pour la peptone de fibrine dès le début de la période de multiplication ralentie.

Il en résulte, d'une part, que la peptone de gélatine ne permet la formation que d'un petit nombre de germes visibles et que, d'autre part, le maximum des bacilles visibles n'est élevé pour la peptone de caséine N° 4 et pour la peptone de fibrine que parce que ce maximum s'y produit très tardivement. Si

l'on excepte ces deux dernières peptones, le maximum des germes visibles se produit entre la vingt-troisième et la trente-quatrième heure de la culture et reste généralement compris entre 4.226.000.000 et 13.200.000.000 de germes par centimètre cube. Ne fait exception que la peptone de gélatine (maximum très faible 1.667.000.000) et la peptone de fibrine (maximum élevé 15.986.000.000). Le maximum des germes visibles se produit, soit en même temps, soit une dizaine d'heures après le maximum des microbes capables de se reproduire sur gélose. Dans un seul cas (peptone de muqueuse), les bacilles visibles ont atteint leur maximum 7 heures avant les bacilles résistants.

Enfin, le maximum des germes visibles semble plus élevé dans les solutions de peptones pancréatiques que dans les solutions de peptones pepsiques de même origine, (peptones de viande N° 1, 2, 6 et 7, d'une part, peptones de caséine N° 5 et 10, d'autre part).

Les *résultats obtenus pour les bacilles « résistants »* conduisent aux remarques suivantes :

Toutes les cultures présentent une période de latence dont la durée varie de 2 heures à 2 h. 30.

Les temps de génération pendant la période de multiplication rapide et pendant la première fraction de la période de multiplication ralentie sont du même ordre de grandeur pour les principales peptones. Ces temps sont au contraire plus élevés pour la peptone de fibrine pendant la phase de multiplication logarithmique et pour la peptone de gélatine, la peptone de caséine N° 4 et la peptone de fibrine pendant la première portion de la phase de multiplication ralentie. De plus, chez ces deux dernières peptones, la multiplication des bacilles résistants s'effectue suivant deux rythmes successifs : les temps de génération croissent d'abord de la deuxième à la vingt-quatrième heure, puis ils diminuent brusquement et recommencent à croître jusqu'à l'arrêt définitif de la multiplication. Nous retrouvons donc le même phénomène que nous avons déjà observé pour les bacilles visibles, phénomène que nous pouvons rapprocher des observations analogues faites par BUCHANAN (8, 9, 10) et HEHEWERTH (26).

En général, les différentes peptones donnent au bout de vingt-deux ou de trente-quatre heures de culture un nombre maximum de bacilles résistants compris entre 2.260.000.000 et 3.996.000.000, soit une variation de 1 à 1,7. Seule la peptone de gélatine donne un chiffre nettement inférieur (1.350.000.000). La peptone de caséine N° 4 et la peptone de fibrine donnent des maxima élevés (caséine 3.600.000.000, fibrine 5.750.000.000), mais ceux-ci se produisent très tardivement (cinquantième et même soixante-quatorzième heure de la culture).

La valeur bactériologique des peptones étudiées se déduira facilement de tous ces résultats :

1° Les peptones de viande (peptones pancréatiques ou peptones pepsiques), la peptone de muqueuse permettent une excellente multiplication du bacille pyocyanique.

2° Les peptones de caséine (peptones pancréatiques ou peptones pepsiques) conviennent également bien à la culture de ce bacille. Cependant, avec certains échantillons (peptones N° 4), la multiplication du bacille pyocyanique est assez lente et les nombres maxima des germes visibles et des germes résistants ne sont atteints qu'après 50 heures de culture. De plus, la multiplication des bacilles visibles semble débiter plus difficilement dans les solutions de peptones de caséine que dans les solutions des autres peptones.

3° La peptone de fibrine permet d'obtenir un nombre très élevé de bacilles « visibles » et de bacilles « résistants », mais ces maxima ne sont obtenus que très tardivement et à la suite d'une multiplication complexe se décomposant en deux phases successives. Cette peptone ne semble pas devoir être retenue pour des essais normaux.

4° La peptone de gélatine paraît peu favorable au développement du bacille pyocyanique, les germes formés étant relativement peu nombreux. Cette constatation doit être rapprochée de l'absence du tryptophane et de la tyrosine dans les peptones de gélatine.

Dans chacun des groupes ainsi constitués, il paraît assez difficile d'établir une différence entre la valeur bactériologi-

que d'une peptone pancréatique et la valeur bactériologique d'une peptone pepsique. Pour les peptones de caséine préparées par nous à partir du même échantillon de caséine, par exemple (peptones 5 et 10), les temps de génération des bacilles visibles et des bacilles résistants sont très voisins les uns des autres pendant les différentes périodes de la multiplication. Il semble seulement que les peptones pancréatiques permettent un développement plus abondant des bacilles visibles que les peptones pepsiques. Pour les peptones pancréatiques de viande, en particulier, le rapport

maximum de bacilles visibles

maximum de bacilles résistants

est compris entre 4 et 6 tandis qu'il n'est égal qu'à 1,8 et 1,9 pour les peptones pepsiques.

Inversement, si nous considérons le nombre des germes encore résistants après un séjour d'une dizaine de jours à l'étuve à 37°, les peptones pepsiques paraissent donner de meilleurs résultats que les peptones pancréatiques.

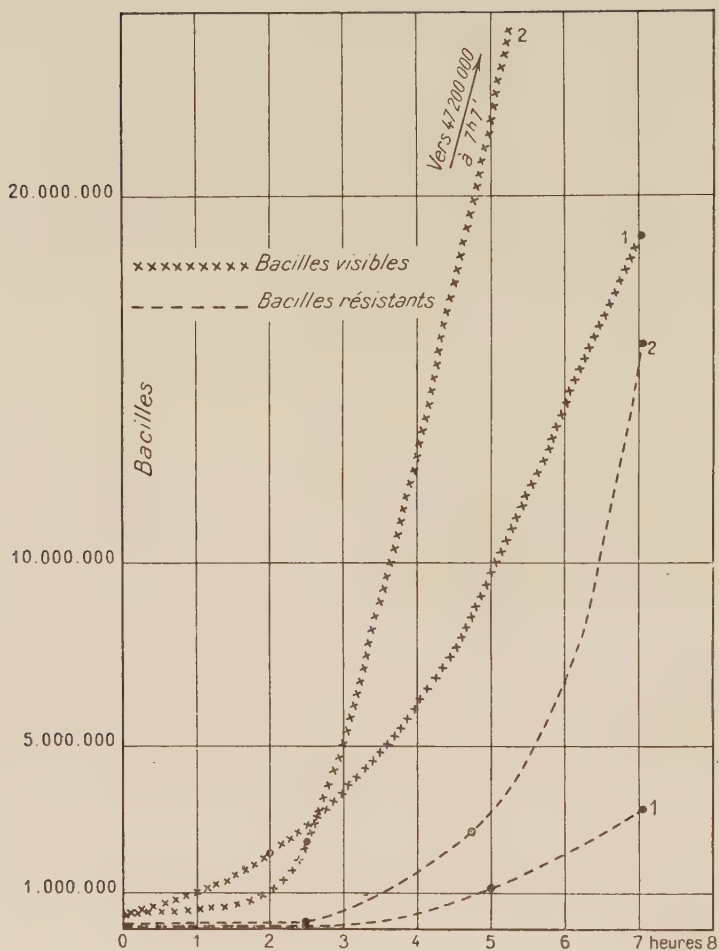
Les courbes suivantes, qui résument l'ensemble de tous ces résultats, présentent toutes les principaux caractères que nous avons mis en évidence en étudiant la multiplication du bacille pyocyanique dans les solutions de peptone pancréatique N° 1 et de peptone pepsique N° 6. Nous y retrouvons cependant les principales anomalies constatées pour les peptones de gélatine, de fibrine et de caséine :

Multiplication relativement lente des bacilles visibles avec la peptone de gélatine pendant les premières heures de la culture (courbe X).

Maxima très faibles obtenus avec cette même peptone (courbe XI).

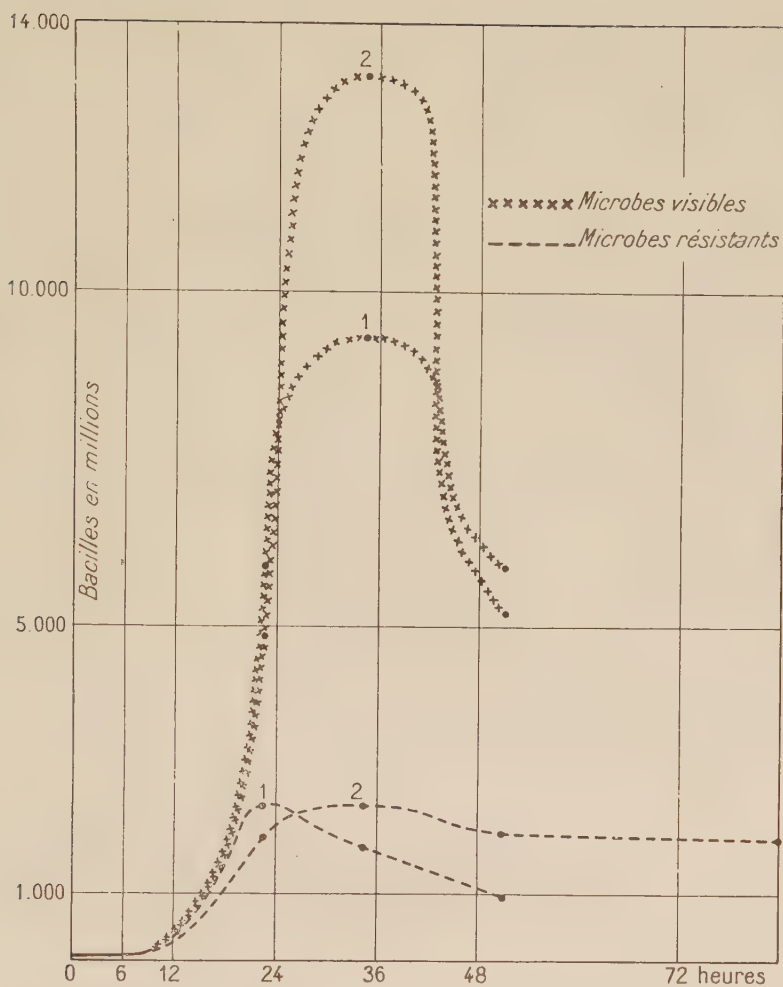
Multiplication retardée avec la peptone de fibrine (courbe XI) et la peptone de caséine N° 4 (courbe XIV).

Croissance microbienne s'effectuant suivant deux cycles successifs pour la peptone de fibrine (courbe XII).



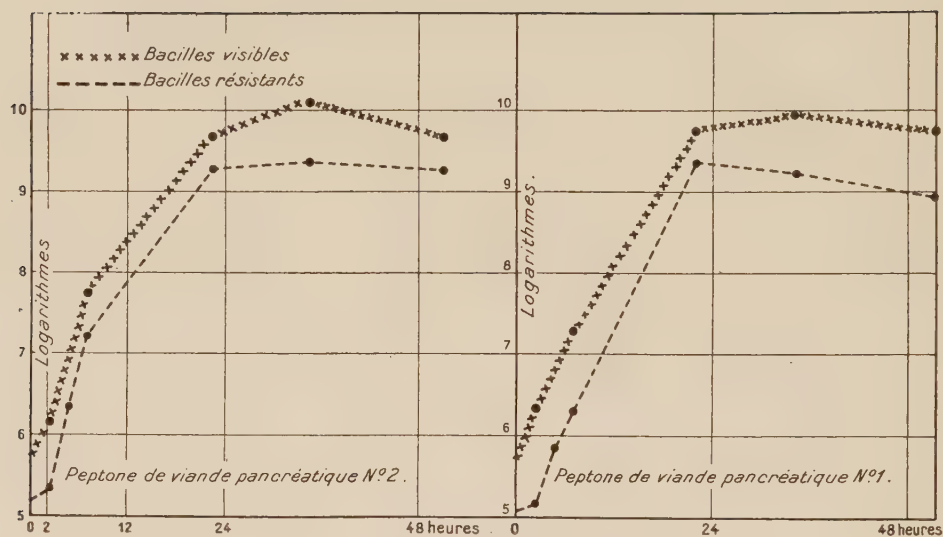
COURBE IV. — Multiplication du bacille pyocyaneus avec les peptones pancréatiques de viande n° 1 et 2.

Premières heures de la culture.



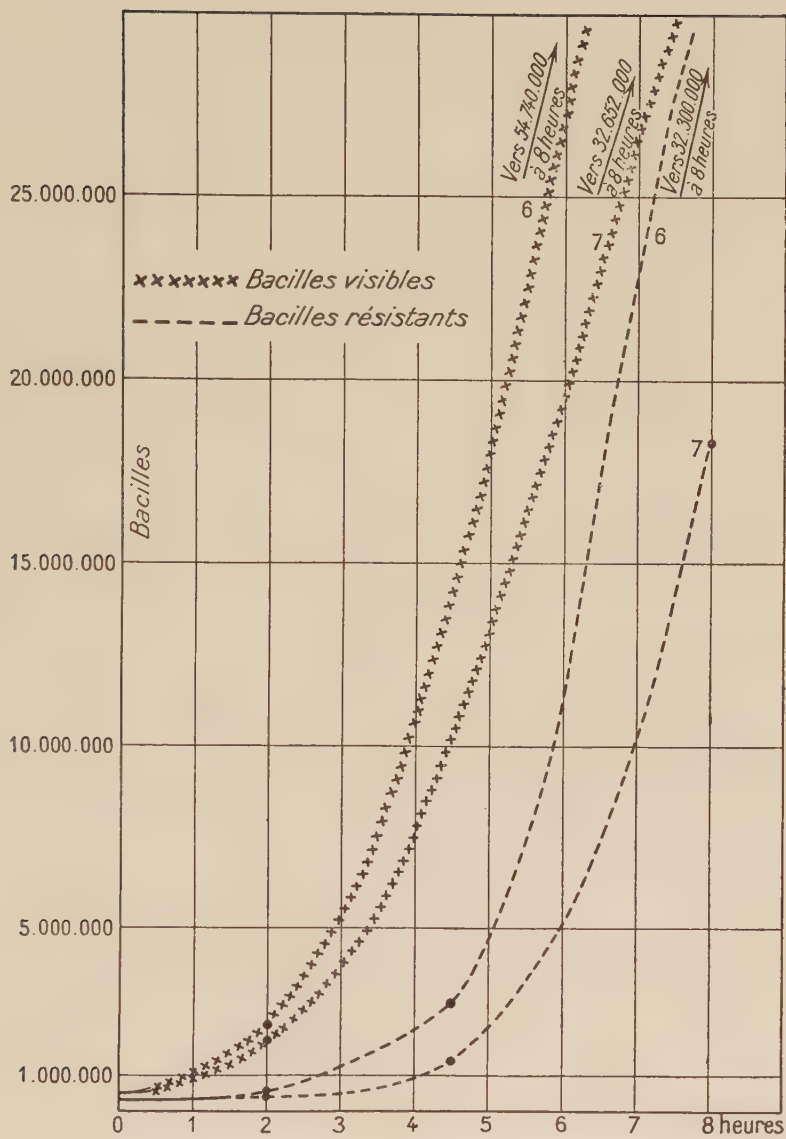
COURBE V. — Multiplication du bacille pyocyaneus avec les peptones pancréatiques de viande n^{os} 1 et 2.

Evolution de la culture.



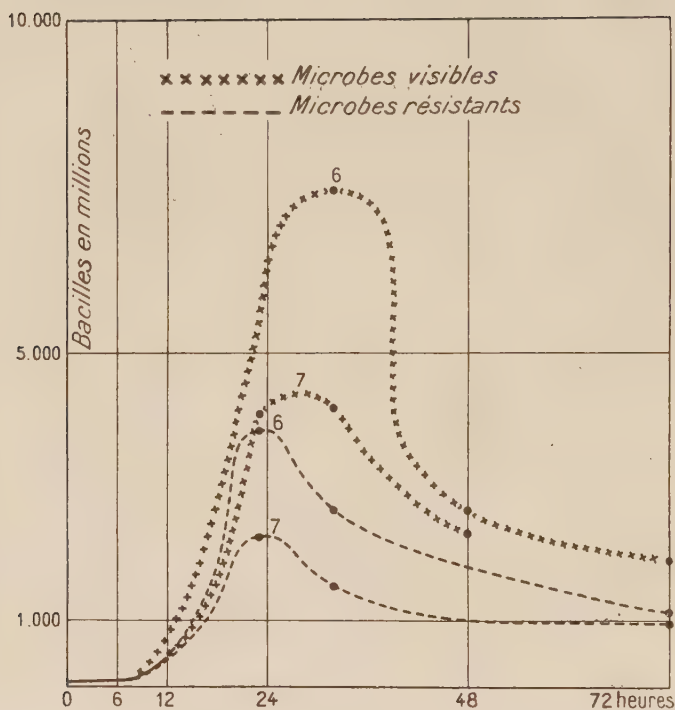
COURBE VI. — Multiplication du bacille pyocyaneus.

*Variations des logarithmes des nombres microbiens
en fonction de l'âge de la culture.*



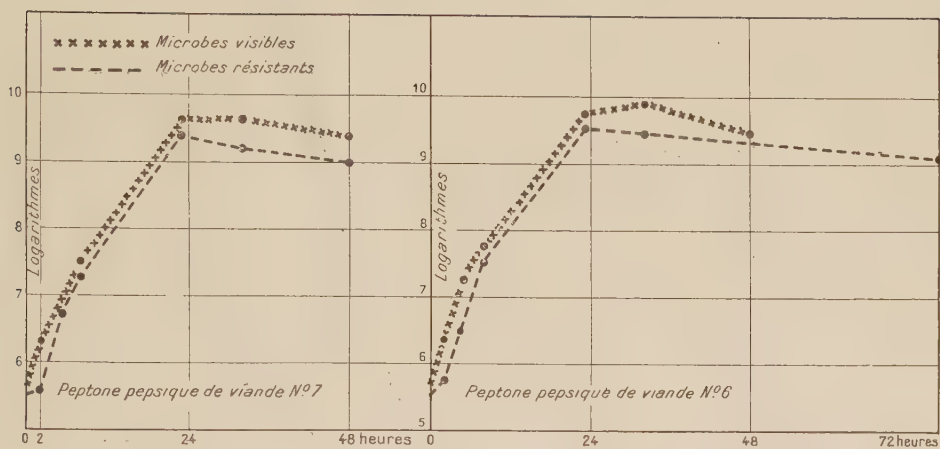
COURBE VII. — Multiplication du bacille pyocyaneus avec les peptones de viande pepsiques n°s 6 et 7.

Premières heures de la culture.



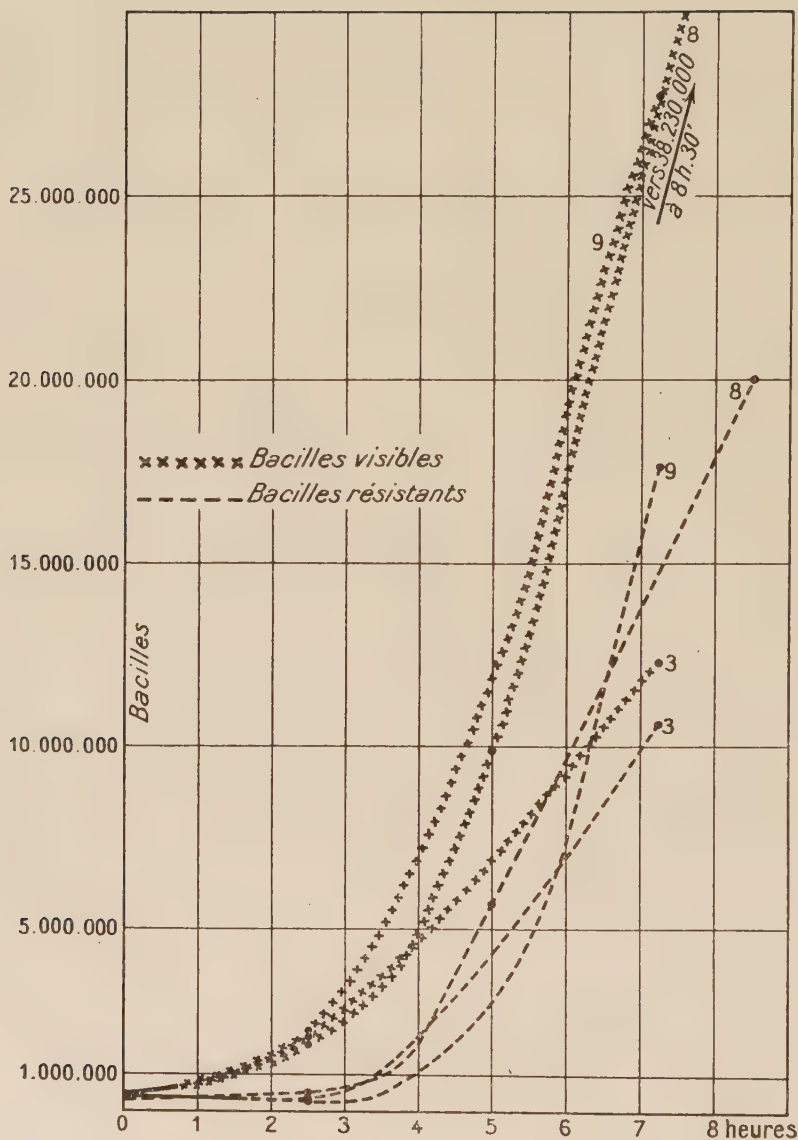
COURBE VIII. — Multiplication du bacille pyocyaneus avec les peptones de viande pepsiques n^{os} 6 et 7.

Evolution de la culture.



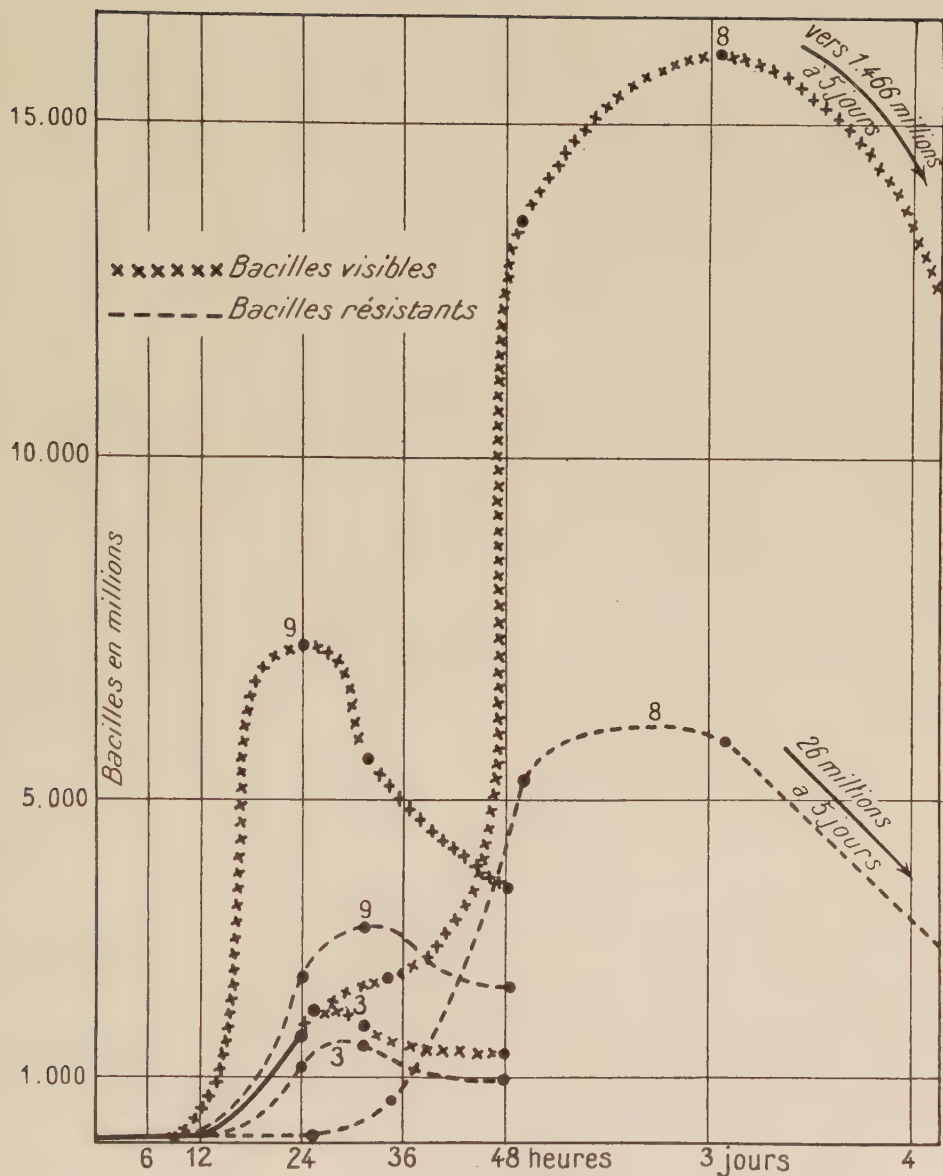
COURBE IX. — Multiplication du bacille pyocyanique.

*Variations des logarithmes des nombres microbiens
en fonction de l'âge de la culture.*



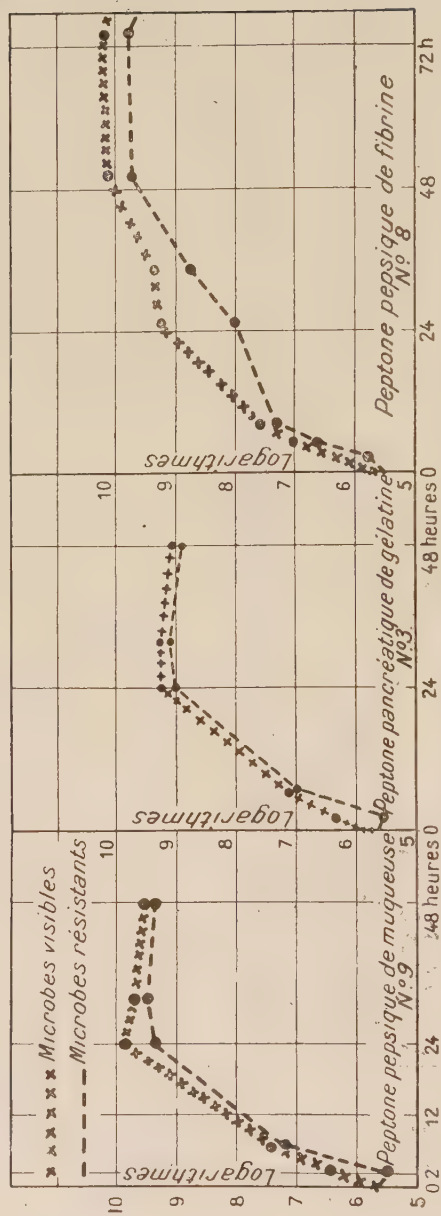
COURBE X. — Multiplication du bacille pyocyaneus
avec les peptones: pancréatique de gélatine n° 3,
pepsique de fibrine n° 8, pepsique de muqueuse n° 9.

Premières heures de la culture.

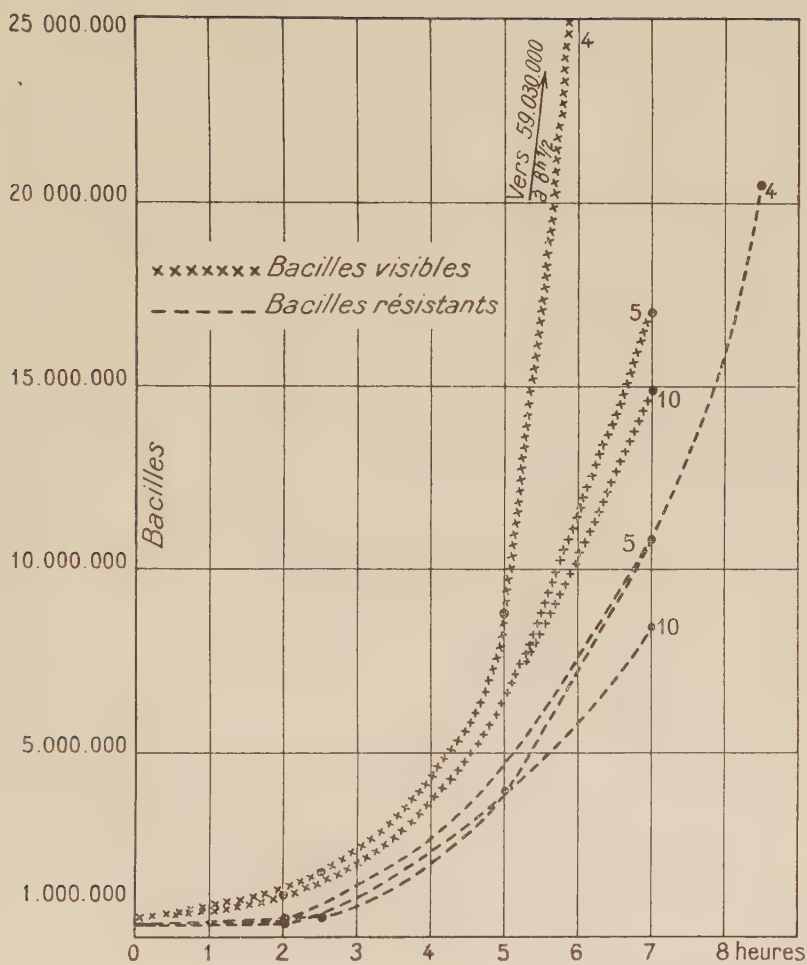


COURBE XI. — Multiplication du bacille pyocyanique
avec les peptones: pancréatique de gélatine n° 3,
pepsique de fibrine n° 8, pepsique de muqueuse n° 9.

Evolution de la culture.

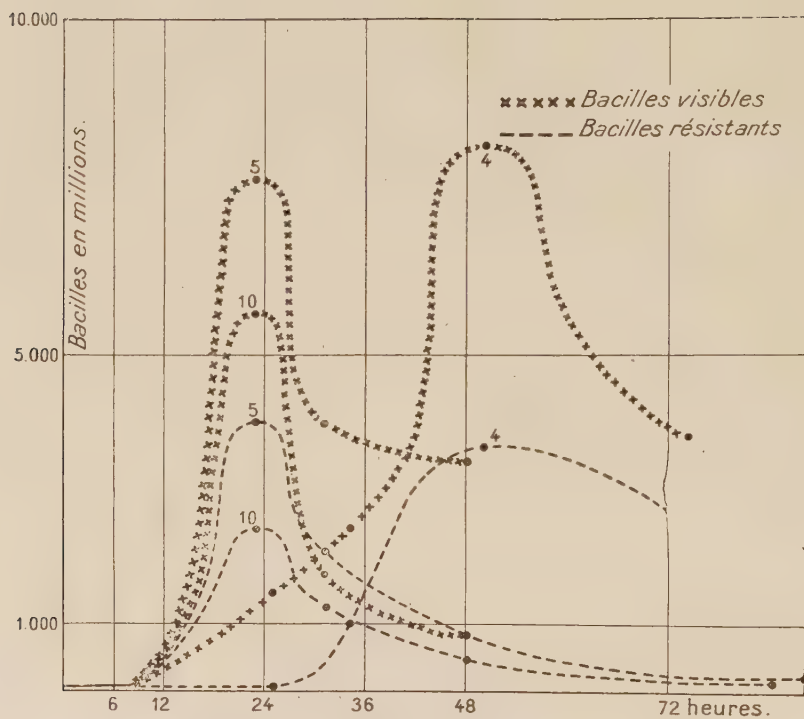


COURBE XII. — Variations des logarithmes des nombres des bacilles en fonction de l'âge de la culture.



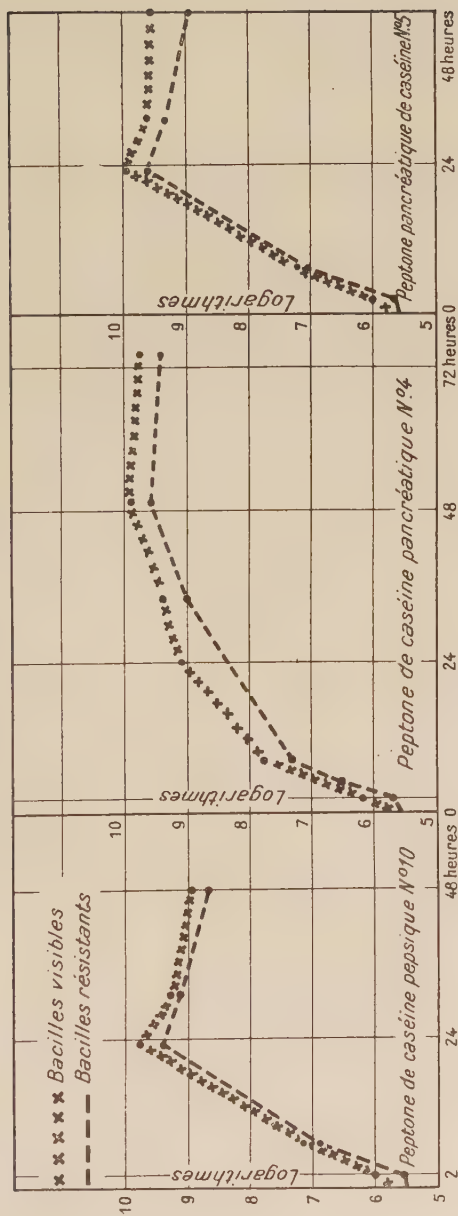
COURBE XIII. — Multiplication du bacille pyocyaneus avec les peptones de caséine pancréatiques n°s 4 et 5 et pepsique n° 10

Premières heures de la culture.



COURBE XIV. — Multiplication du bacille pyocyanique
avec les peptones de caséine pancréatiques n^{os} 4 et 5
et pepsique n^o 10.

Evolution de la culture.



COURBE XV. — Multiplication du bacille pyocyaneus.

Variations des logarithmes des nombres microbiens
en fonction de l'âge de la culture.

6° Culture du bacille pyocyanique en solutions de peptones dialysées.

Les essais que nous venons de passer en revue nous ont montré que la multiplication du bacille pyocyanique s'effectuait d'une façon sensiblement uniforme dans la majorité des peptones que nous avions à notre disposition. En particulier, il ne semble pas que les peptones pancréatiques et les peptones pepsiques présentent des valeurs bactériologiques nettement distinctes. Malgré les variations importantes constatées dans la composition chimique des milieux utilisés, le bacille pyocyanique trouve, dans presque tous les cas, un excès des principaux éléments nutritifs indispensables à sa croissance. Il est donc nécessaire de simplifier nos milieux pour essayer de faire apparaître des différences entre les valeurs bactériologiques des peptones pepsiques et des peptones pancréatiques et pour rechercher si la croissance microbienne est en rapport avec la quantité d'un ou de plusieurs éléments simples mis à la disposition de la bactérie.

Nous avons ainsi été amené à dialyser nos peptones et à ensemercer le bacille pyocyanique dans les solutions de peptones dialysées. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, la dialyse élimine en même temps que des composés minéraux une portion souvent importante de l'azote aminé et de l'azote ammoniacal mais, étant donné que les peptones ordinaires paraissent beaucoup trop riches en éléments nutritifs indispensables, il ne semble pas que cette élimination soit suffisante pour nous faire écarter, *a priori*, les peptones ainsi traitées.

Enfin nous avons essayé de mettre en évidence les modifications chimiques apportées à la constitution des milieux de culture par la multiplication microbienne en comparant la composition chimique des milieux primitifs stériles à celle des mêmes milieuxensemencés et débarrassés des corps microbiens au moment du maximum de la croissance.

Nous avons soumis à la dialyse 5 peptones choisies parmi celles qui nous avaient fourni les résultats les plus intéressants :

2 peptones de viande : peptone pancréatique N° 1 et peptone pepsique N° 6 ;

2 peptones de caséine : peptone pancréatique N° 5 et peptone pepsique N° 10 ;

1 peptone de muqueuse : peptone pepsique N° 9.

Nos essais ont été conduits de la façon habituelle.

L'évolution des cultures s'est effectuée à peu près de la même façon avec les peptones dialysées qu'avec les peptones ordinaires. Là encore, nous avons observé un trouble vers la septième heure après l'ensemencement, trouble qui a augmenté jusqu'au deuxième jour. Si l'on excepte la peptone de viande N° 6 pour laquelle nous avons observé une coloration verte de la culture à partir de la vingt-quatrième heure, nos autres milieux dialysés ne nous ont jamais donné ni voile ni fluorescence verte.

Nos résultats sont groupés dans les tableaux et les courbes suivantes :

PEPTONE PANCRÉATIQUE N° 1 DIALYSÉE

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉSISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	480.000	450.000
2 heures	1.570.000	1.290.000	523.000	640.000
7 heures	45.300.000		22.600.000	
7 heures 30'..		30.430.000		15.000.000
24 heures	7.306.000.000	6.790.000.000	4.260.000.000	4.800.000.000
33 heures	737.000.000	3.098.000.000	1.630.000.000	2.100.000.000
46 heures	1.220.000.000		833.000.000	
47 heures 30'..		1.899.000.000		1.400.000.000

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699		465.000	5,667	
2 heures	1.430.000	6,155	80'	581.000	5,764	400'
7 heures 15'..	37.865.000	7,578	67'	18.830.000	7,275	63'
24 heures	7.048.000.000	9,848	134'	4.530.000.000	9,656	127'
33 heures	1.965.000.000	9,287		1.866.500.000	9,271	
46 heures 45'..	1.559.500.000	9,133		1.116.500.000	9,048	

PEPTONE PEPSIQUE N° 6 DIALYSÉE

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉSISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	490.000	410.000
2 heures	1.050.000	1.210.000	513.000	443.000
7 heures	15.230.000		9.660.000	
8 heures		33.200.000		16.000.000
24 heures	5.289.000.000	6.389.000.000	2.600.000.000	3.066.000.000
33 heures	548.500.000	2.075.000.000	1.400.000.000	1.600.000.000
46 heures	1.240.000.000		1.100.000.000	
48 heures		2.031.000.000		1.033.000.000

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699	102' 75' 125'	450.000	5,653	1500'
2 heures	1.130.000	6,053		478.000	5,679	
7 heures 30'..	24.215.000	7,384		12.830.000	7,108	70'
24 heures	5.839.000.000	9,766		2.833.000.000	9,452	128'
33 heures				1.500.000.000	9,176	
47 heures	1.635.500.000	9,214		1.066.500.000	9,028	

PEPTONE DE MUQUEUSE N° 9 DIALYSÉE

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉSISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	303.000	480.000
2 heures	970.000		226.000	
3 heures		969.000		580.000
8 heures	4.490.000		2.660.000	
9 heures		4.660.000		2.660.000
23 heures 30 ..	1.947.000.000		900.000.000	
25 heures		1.249.000.000		28.000.000
30 heures	2.827.000.000		1.100.000.000	
33 heures		2.163.000.000		760.000.000
48 heures	3.896.000.000	4.026.000.000	1.200.000.000	1.066.000.000
72 heures	1.950.000.000	1.743.000.000	813.000.000	233.000.000

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699	} 157' 163' 112' 725' 1500'	391.500	5,593	} 3750' 133' 127' 435' 3535'
2 heures 30'..	969.000	5,986		403.000	5,605	
8 heures 30'..	4.575.000	6,660		2.660.000	6,425	
24 heures 15'..	1.598.000.000	9,204		464.000.000	8,666	
31 heures 30'..	2.495.000.000	9,397		930.000.000	8,969	
48 heures	3.961.000.000	9,598		1.133.000.000	9,054	
72 heures	1.846.000.000	9,266		523.000.000	8,718	

PEPTONE DE CASÉINE N° 5 DIALYSÉE

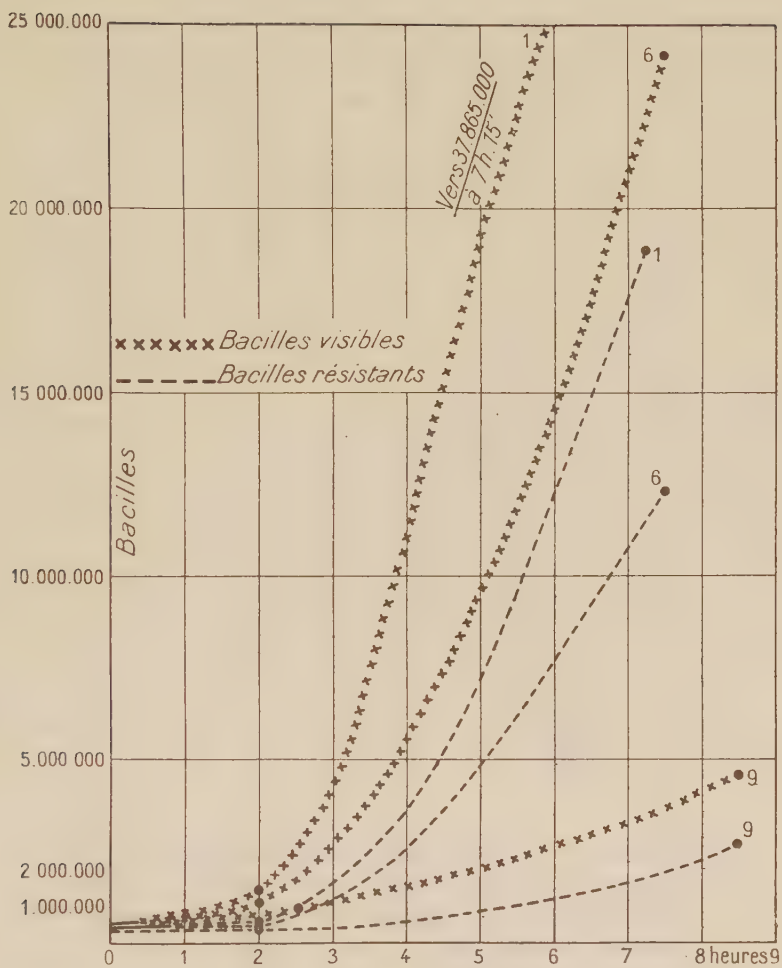
AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	410.000	310.000
2 heures	3.740.000		420.000	
3 heures		4.250.000		433.000
7 heures		42.600.000		5.000.000
8 heures	66.460.000		8.000.000	
24 heures	9.240.000.000		5.100.000.000	
24 heures 30'..		8.474.000.000		2.000.000.000
30 heures	2.310.000.000		1.400.000.000	
33 heures 30'..		3.178.000.000		1.330.000.000
48 heures	1.657.000.000	2.014.000.000	1.233.000.000	1.100.000.000

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699		360.000	5,556	
2 heures 30'..	3.995.000	6,601	50'	426.000	5,629	625'
7 heures 30'..	54.530.000	7,737	81'	6.500.000	6,813	77'
24 heures 15'..	8.837.000.000	9,946	137'	3.550.000.000	9,550	111'
31 heures 45'..	2.744.000.000	9,438		1.365.000.000	9,135	
48 heures	1.835.000.000	9,264		1.166.000.000	9,067	

PEPTONE DE CASÉINE N° 10 DIALYSÉE

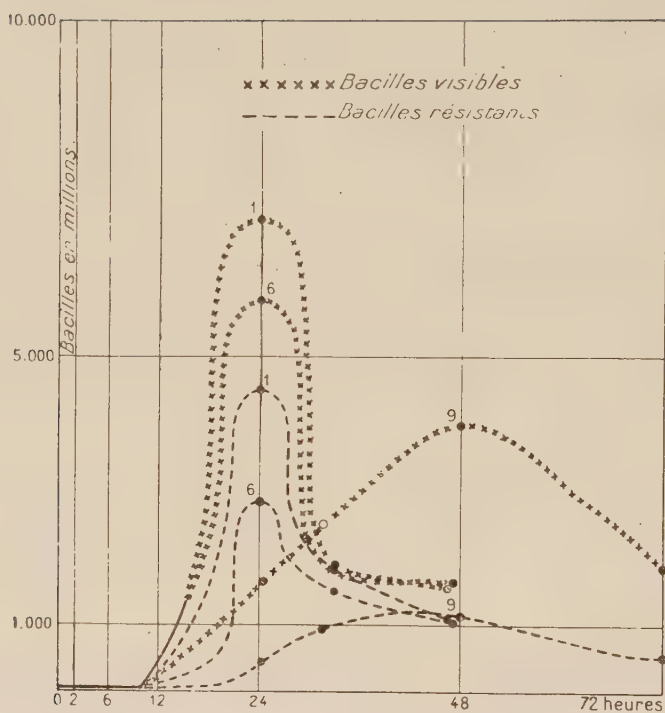
AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉSISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0	500.000	500.000	383.000	410.000
2 heures	2.230.000		390.000	
2 heures 30'..		3.130.000		493.000
7 heures		24.920.000		13.000.000
8 heures	22.530.000		11.000.000	
24 heures	7.030.000.000		4.633.000.000	
25 heures		6.922.000.000		3.900.000.000
30 heures	1.984.000.000	2.385.000.000	1.100.000.000	1.333.000.000
48 heures	1.435.000.000	1.398.000.000	1.000.000.000	900.000.000

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0	500.000	5,699		396.000	5,598	
2 heures 15'..	2.680.000	6,498	56'	441.000	5,644	1350'
7 heures 30'..	23.720.000	7,375	101'	12.000.000	7,079	67'
24 heures 30'..	6.976.000.000	9,844	124'	4.266.000.000	9,630	120'
30 heures	2.189.000.000	9,340		1.216.000.000	9,085	
48 heures	1.416.500.000	9,282		950.000.000	8,971	



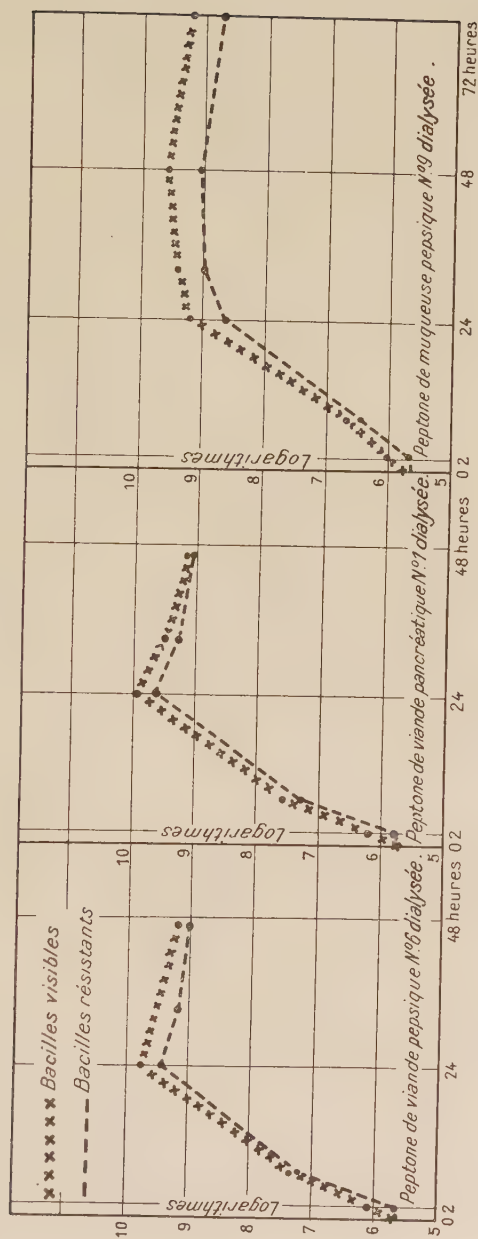
COURBE XVI. — Multiplication du bacille pyocyaneus avec les peptones dialysées suivantes: peptone de viande pancréatique n° 1, peptone de viande pepsique n° 6, peptone de muqueuse pepsique n° 9.

Premières heures de la culture.



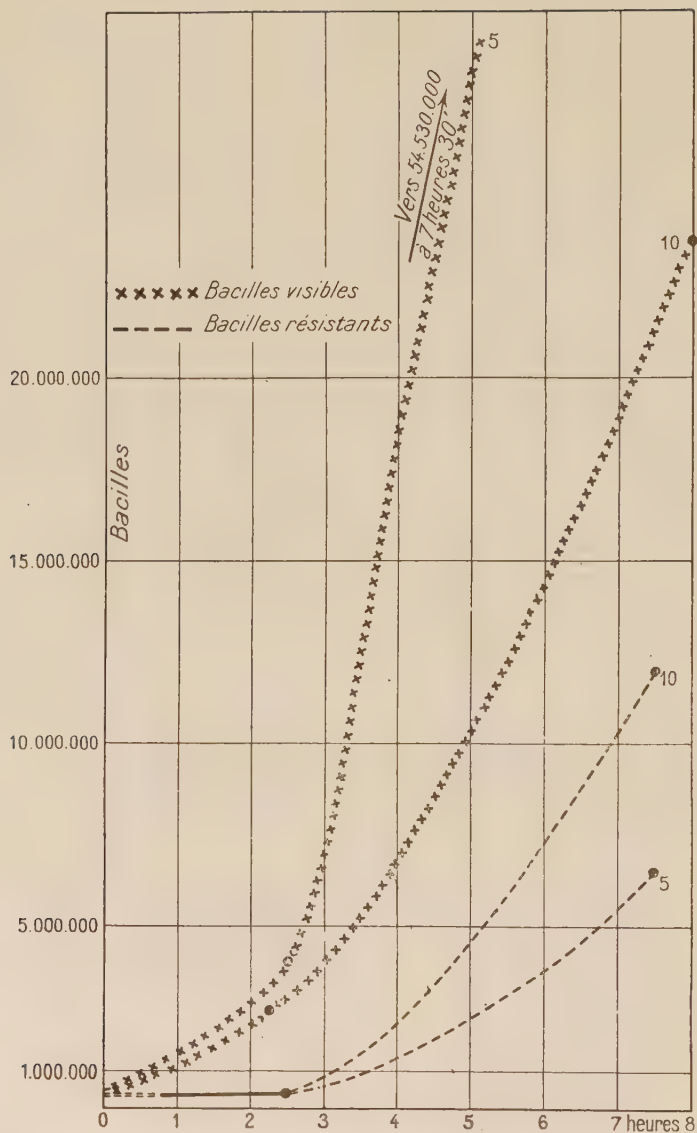
COURBE XVII. — Multiplication du bacille pyocyanique dans les peptones *dialysées* suivantes: peptone de viande pancréatique n° 1, peptone de viande pepsique n° 6, peptone de muqueuse pepsique n° 9.

Evolution de la culture.



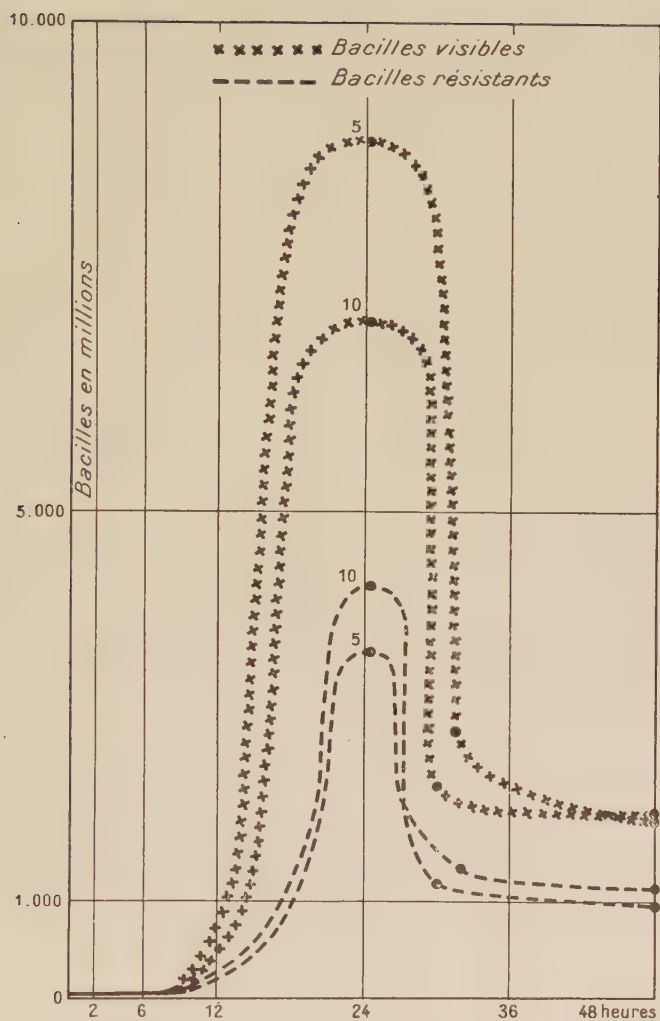
COURBE XVIII. — Multiplication du bacille pyocyanique.

Variations des logarithmes des nombres microbiens
en fonction de l'âge de la culture.



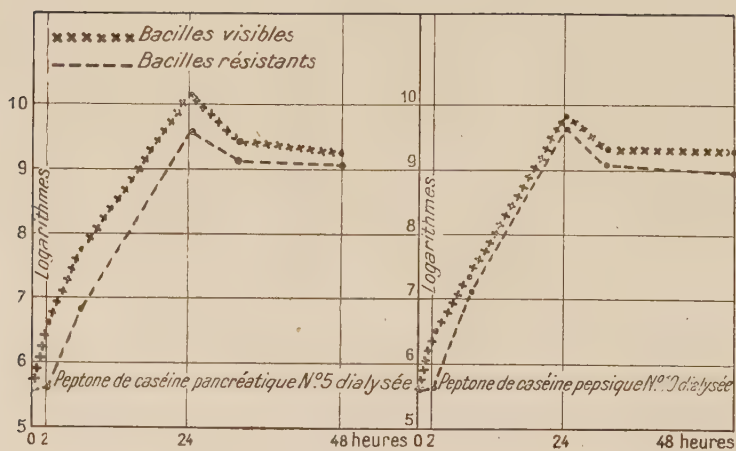
COURBE XIX. — Multiplication du bacille pyocyaneus avec les peptones de caséine dialysées: peptone pancréatique de caséine n° 5, peptone pepsique de caséine n° 10.

Courbe des premières heures de l'évolution.



COURBE XX. — Multiplication du bacille pyocyaneus avec les peptones de caséine *dialysées*: peptone pancréatique de caséine n° 5, peptone pepsique de caséine n° 10.

Evolution de la culture.



COURBE XXI. — Multiplication du bacille pyocyaneus.

Variations des logarithmes des nombres microbiens
en fonction de l'âge de la culture.

Les résultats ainsi obtenus sont tout à fait comparables à ceux que nous avons déjà observés, nous pouvons donc en conclure que le bacille pyocyanique se multiplie de la même façon dans les solutions de peptones ordinaires et dans les solutions de peptones dialysées. Ici encore, nous constatons que la multiplication des bacilles visibles commence aussitôt après l'ensemencement tandis que celle des bacilles capables de se reproduire sur milieu gélosé est précédée d'une phase de latence importante. Enfin pendant la période de multiplication rapide, les temps de génération des bacilles résistants sont plus petits que les temps de génération des bacilles visibles, mais l'augmentation constante des temps de génération des bacilles visibles, depuis l'ensemencement jusqu'au moment du maximum, est moins nette avec les solutions de peptones dialysées qu'avec les solutions de peptones normales.

Pour pouvoir comparer plus facilement nos essais, nous avons réuni dans les tableaux suivants les principaux résultats trouvés pour les peptones dialysées et les chiffres correspondants obtenus avec les mêmes peptones non dialysées. Comme pour les peptones ordinaires, nous avons distingué dans l'évolution de la poussée microbienne un certain nombre de périodes auxquelles nous avons attribué des durées correspondant aux résultats moyens trouvés dans nos expériences antérieures. Il en résulte que si pendant la période dite « logarithmique », la multiplication est toujours très rapide, elle peut n'être pas toujours rigoureusement géométriquement accélérée pendant toute la durée de cette période.

MICROBES VISIBLES

[illegible]

MICROBES RÉSISTANTS

	PEPTONES DIALYSÉES						PEPTONES PURES					
	Viande		Muqueuse		Caséine		Viande		Muqueuse		Caséine	
	Pancréa- tique	Pepsique	Pancréa- tique	Pepsique	Pancréa- tique	Pepsique	Pancréa- tique	Pepsique	Pancréa- tique	Pepsique	Pancréa- tique	Pepsique
TEMPS DE GÉNÉRATION PENDANT :	N° 1	N° 6	N° 9	N° 10	N° 5	N° 10	N° 1	N° 6	N° 9	N° 5	N° 10	
<i>Période dite de latence : 0 à 2 heures ou</i>												
2 h. 30'.....	400'	1.500'	3.750'	1.350'	625'	517'	171'	∞	666'	1.200'		
<i>Période dite de multiplication logarithmique :</i>												
a) 2 heures à 7 heures 30'.....	63'	70'	133'	67'	77'	61'	62'	49'	65'	65'		
b) 2 h. 30' à 8 h. 30'.....												
<i>Période de multiplication ralentie :</i>												
a) 7 h. 30' à 24 h.	127'	128'	127'	120'	111'	97'	130'	144'	113'	118'		
8 h. 30' à 24 h.			127'									
b) 24 h. à 32 h.			435'						1.153'			
c) 32 h. à 48 heures.....			3.535'									
HEURE DU MAXIMUM	24 h.	24 h.	48 h.	24 h. 30'	24 h. 15'	22 h. 30'	23 h.	31 h. 30'	23 h.	23 h.		
VALEUR DU MAXIMUM (en mil- lions)	4.530	2.833	1.133	4.266	3.550	2.316	3.865	3.095	3.996	2.415		

L'examen de ces tableaux conduit aux remarques suivantes :

1° Les peptones de viande dialysées (peptone pancréatique N° 1, peptone pepsique N° 6) et les peptones de caséine dialysées (peptone pancréatique N° 5, peptone pepsique N° 10) donnent des résultats voisins. Les temps de génération calculés pour les bacilles visibles d'une part et pour les bacilles résistants d'autre part sont du même ordre de grandeur. Enfin les nombres trouvés pour les microbes visibles et pour les microbes capables de se reproduire sur gélose passent tous par leur maximum à la vingt-quatrième heure de la culture. Les valeurs maxima ainsi obtenues sont comprises entre 5.839.000.000 et 8.537.000.000 pour les bacilles visibles et entre 2.833.000.000 et 4.530.000.000 pour les bacilles résistants, les variations ainsi observées restent donc comprises entre 1 et 1,6.

Il ne semble pas exister de différences importantes entre les peptones pancréatiques et les peptones pepsiques. Nous pouvons cependant noter que, comme pour les peptones ordinaires, les peptones dialysées pancréatiques paraissent fournir un nombre plus élevé de bacilles visibles que les peptones pepsiques.

2° La comparaison des temps de génération et l'examen des courbes logarithmiques montrent que la peptone de muqueuse dialysée ne permet qu'une multiplication relativement lente des bacillesensemencés. Cette multiplication se poursuit plus longuement que dans les solutions dialysées des autres peptones, puisque les germes formés n'atteignent leurs maxima qu'après 48 heures de séjour à l'étuve, et cependant ces maxima sont nettement inférieurs à ceux qui sont fournis par les autres essais.

3° Si l'on excepte la peptone de muqueuse, dont la valeur bactériologique a été nettement abaissée par la dialyse, on n'observe pas entre la multiplication du bacille pyocyane en eau peptonée ordinaire et en eau peptonée dialysée de différences aussi grandes que l'on aurait pu le supposer.

Les seules variations observées sont les suivantes :

a) La multiplication des bacilles visibles pendant les deux

ou trois premières heures de la culture, période dite « de latence », semble plus rapide chez les peptones ordinaires que chez les peptones dialysées. Les peptones de caséine font pourtant exception et le ralentissement observé au début de la culture dans les peptones normales ne se retrouve plus dans les peptones dialysées.

b) La multiplication des bacilles capables de se reproduire sur gélose est un peu plus rapide, pendant la phase de multiplication logarithmique, dans les eaux peptonées ordinaires que dans les eaux peptonées dialysées.

c) Tandis qu'avec les peptones commerciales le maximum des germes visibles n'est atteint, assez souvent, qu'une dizaine d'heures après le maximum des germes résistants, avec les peptones dialysées, au contraire, ces deux maxima se produisent toujours en même temps.

d) La multiplication plus rapide des bacilles visibles et des bacilles résistants dans les eaux peptonées ordinaires pendant les premières périodes de la culture devrait avantager ces dernières par rapport aux eaux peptonées dialysées. Cependant, si les nombres maximums de germes formés sont, en général, plus élevés avec les solutions peptonées simples qu'avec les solutions dialysées, les différences ne sont souvent pas très grandes et il arrive même que des peptones dialysées fournissent des résultats supérieurs à ceux des peptones simples correspondantes.

Nous avons résumé dans les courbes ci-dessous la multiplication du bacille pyocyanique dans la peptone pepsique N° 6 et dans la même peptone dialysée.

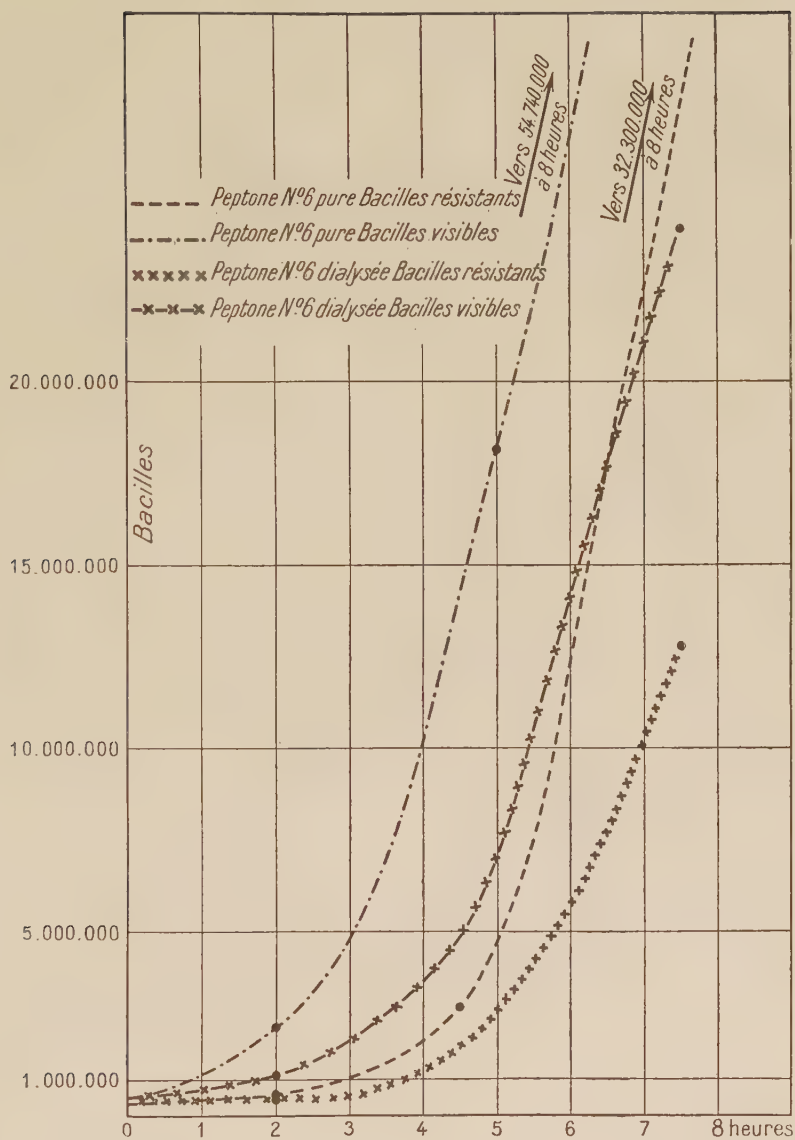
Ces courbes mettent en évidence les trois premiers points sur lesquels nous venons d'insister :

1° En effet, pendant les deux premières heures de la poussée avec les bacilles visibles le temps de génération est de 53 minutes avec la peptone pure et de 102 minutes avec la peptone dialysée ; il s'ensuit naturellement une pente plus forte de la courbe logarithmique dans le premier cas.

Nous pouvons exceptionnellement avec cette peptone de viande pepsique faire la même constatation pendant cette période dite de latence, avec les germes capables de se reproduire.

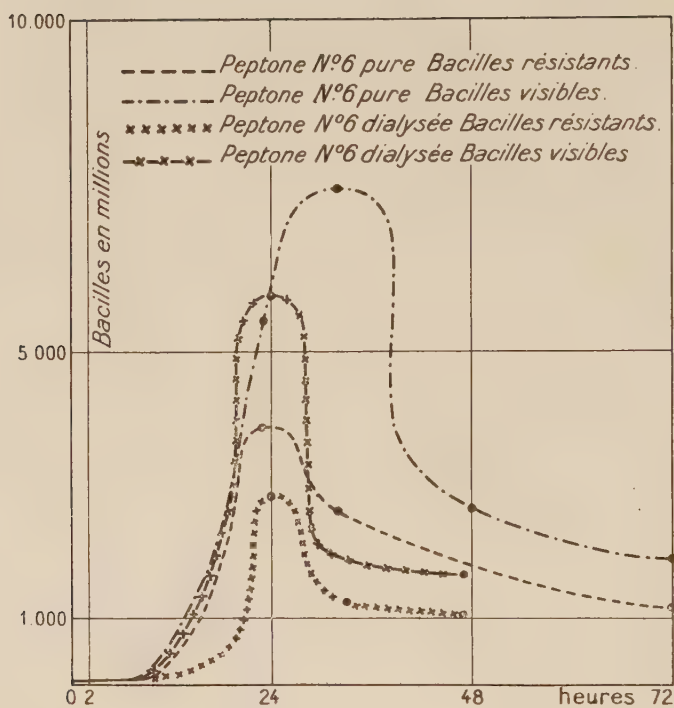
2° Avec les bacilles « résistants » pendant la phase de multiplication logarithmique, nous avons observé un temps de génération de 62 minutes avec la peptone commerciale et un de 70 minutes avec la peptone dialysée, d'où une pente de la courbe logarithmique un peu plus forte dans le premier cas correspondant à une multiplication légèrement plus rapide.

3° La peptone dialysée nous a donné ses maxima « résistants » et « visibles » après 24 heures de poussée, alors qu'avec la peptone pure le maximum des germes visibles s'est produit à 32 heures, soit 9 heures après celui des bacilles capables de se reproduire.



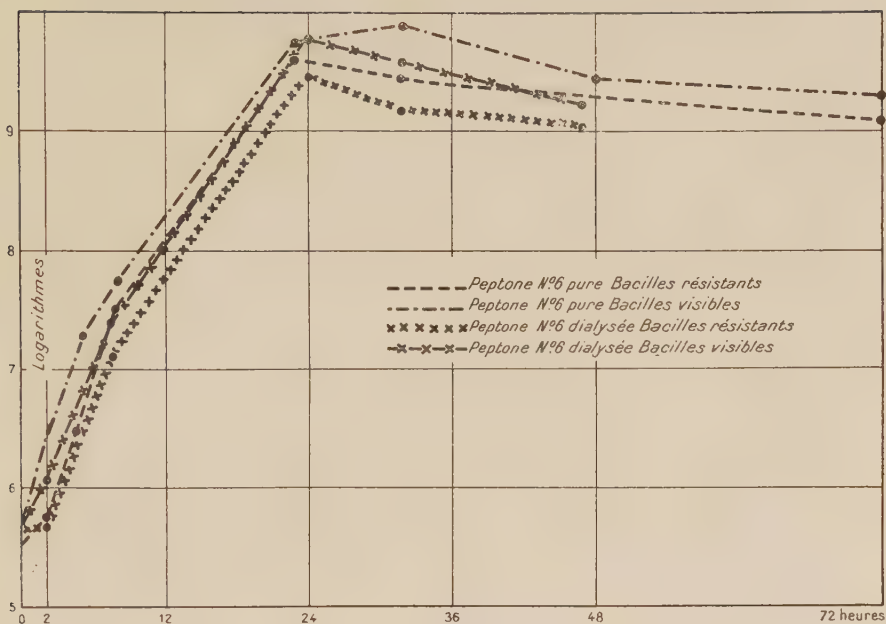
COURBE XXII. — Multiplication du bacille pyocyaneus
avec la peptone de viande pepsique n° 6
et la même peptone après dialyse.

Premières heures de la culture.



COURBE XXIII. — Multiplication du bacille pyocyaneus avec la peptone de viande pepsique n° 6 et la même peptone après dialyse.

Evolution de la culture.



COURBE XXIV. — Multiplication du bacille pyocyaneus
avec la peptone de viande pepsique n° 6
et la même peptone après dialyse.

*Variations des logarithmes des nombres microbiens
en fonction de l'âge de la culture.*

IV. — MODIFICATION DE LA COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE SOUS L'INFLUENCE DE LA MULTIPLICATION MICROBIENNE

La dialyse a éliminé de nos solutions de peptones une forte proportion des éléments minéraux et des composés organiques solubles qui y étaient contenus. Si l'importance de la multiplication microbienne est en rapport avec la teneur des milieux de culture en éléments chimiques facilement dosables, cette relation devra être particulièrement apparente dans les milieux ainsi simplifiés. De plus en comparant la composition d'une eau peptonée dialysée stérile à celle de la même eau peptonéeensemencée et débarrassée des corps microbiens au moment où le nombre des germes commence à décroître, nous verrons si l'arrêt de la multiplication microbienne peut être expliqué par des variations importantes de la constitution des milieux de culture. Les constatations ainsi faites nous renseigneront également sur le rôle joué par tel ou tel élément chimique et nous permettront, peut-être, d'améliorer nos milieux par addition de principes chimiquement définis.

Nos essais ont été conduits de la façon suivante :

L'eau peptonée dialysée, provenant d'une même préparation, a été répartie à raison de 400 ou de 200 cm³ dans des matras en pyrex de 1 litre ou de 500 cm³, renfermant déjà quelques billes de verre. Le tout a été stérilisé à l'autoclave à 115° pendant 20 minutes.

La composition du milieu initial a été déterminée sur le contenu de deux ballons ainsi préparés, les examens nécessitant environ 500 cm³ de solution.

Deux autres matras (un de 200 cm³ et un de 400 cm³) ont été ensuiteensemencés à raison de 500.000 bacilles visibles par cm³ et placés à l'étuve de 37°. Les matras étaient agités fréquemment et des prises d'essais successives permettaient d'y suivre la multiplication des germes visibles et des germes résistants. Au bout de 48 heures de séjour à l'étuve, les liqui-

des de culture ont été filtrés sur bougie CHAMBERLAND, pour en éliminer les corps microbiens, puis soumis à l'analyse.

Tous nos essais ont été arrêtés à la quarante-huitième heure de la culture. Un séjour à l'étuve plus prolongé aurait certainement provoqué des variations plus importantes de la composition chimique des milieux étudiés, mais aux changements résultant de la formation d'un plus grand nombre de germes seraient venues se superposer des modifications apportées par la lyse de cellules déjà mortes de sorte que les résultats obtenus auraient été plus difficiles à interpréter. Au bout de 48 heures, au contraire, les germes formés ont atteint leur nombre maximum et les différences observées entre la constitution d'un milieu stérile et celle du même milieu ensemené peuvent être attribuées uniquement aux modifications chimiques résultant de la formation des cellules microbiennes.

Avant d'être filtré à la bougie le liquide de culture est d'abord passé à plusieurs reprises sur un filtre en papier afin d'en séparer la majeure partie des corps microbiens qui provoqueraient très rapidement le colmatage de la porcelaine poreuse. La filtration est ensuite conduite lentement de façon à éviter une dépression trop accentuée, car il importe de maintenir dans le liquide les composés volatils qui ont pris naissance pendant le croît microbien. P. MOLLIEX (45), en cultivant le *Bacillus foecalis alcaligenes*, et surtout M. LEMOIGNE, O. DOP-TER et R. DESNEAUX (36), en utilisant différentes bactéries parmi lesquelles se trouvait le bacille pyocyanique, ont montré qu'on n'observait pas de pertes d'azote volatil pour un séjour à l'étuve ne dépassant pas 9 jours.

Le filtrat ainsi obtenu a toujours été analysé le plus rapidement possible. Si toutes les déterminations ne pouvaient pas être commencées le jour même, on ajoutait au liquide un peu de toluène pour assurer sa conservation. Dans tous les cas, la mesure de la tension superficielle et le dosage du carbone ont été effectués sur le liquide récemment filtré et ne contenant aucune substance étrangère.

Tous nos résultats sont réunis dans les tableaux suivants dans lesquels nous indiquons la composition du milieu sté-

rile, celle du même milieu filtré à la quarante-huitième heure de la culture et les variations observées pour les principaux éléments. Ces variations sont données en valeurs absolues et en pourcentage des quantités primitivement contenues dans le milieu stérile. Enfin nous avons également rapporté pour mémoire les nombres maximums de bacilles visibles et de bacilles vivants obtenus avec les milieux considérés.

	PEPTONE PANCRÉATIQUE DE VIANDÉ N° 1				PEPTONE PEPSIQUE DE VIANDÉ N° 6				PEPTONE PEPSIQUE DE MUQUEUSE N° 9			
	Milieu stérile	Culture filtrée	Variation		Milieu stérile	Culture filtrée	Variation		Milieu stérile	Culture filtrée	Variation	
			Valeur absolue	observée Pour- centage			Valeur absolue	observée Pour- centage			Valeur absolue	observée Pour- centage
pH	7,0	7,6	+ 0,6		7,3	7,8	+ 0,5		7,3	7,8	+ 0,5	
Tension superficielle 5 cm ³	102 gttes	101 gttes	— 1		108,5	106	— 2,5		105	104	— 1	
Déviation polarimétrique (l=1)	— 13'	— 13'	0		— 28'	— 22'	— 6'		— 20'	— 18'	— 2'	
Azote total (en gr. par litre)	0,868	0,784	— 0,084	9,5 %	0,91	0,75	— 0,16	17,5 %	0,672	0,616	0,056	8,5 %
Azote amino-ammoniacal	0,098	0,155	+ 0,057	57,5 %	0,084	0,155	+ 0,071	8,5 %	0,084	0,084	0	0
Azote ammoniacal	0,0303	0,098	+ 0,067	22 %	0,014	0,094	+ 0,080	571 %	0,042	0,070	+ 0,028	66,5 %
Azote aminé	0,068	0,057	— 0,011	16 %	0,070	0,061	— 0,009	13 %	0,042	0,014	— 0,028	66,5 %
Azote formol	11,5	19,5			9,5	20,5			12,5	13,5		
Azote total												
Carbone	3,11	2,55	— 0,56	18 %	3,49	3,11	— 0,38	11 %	1,77	3,40	— 0,37	21 %
Carbone												
Azote total	3,5	3,2			3,8	4,1			2,6	2,2		
Phosphore total	0,0148	0,0116	— 0,0032	21,5 %	0,017	0,013	— 0,004	23,5 %	0,008	0,006	— 0,002	25 %
Phosphore organique	0,0148	0,0116	— 0,0032	21,5 %	0,017	0,013	— 0,004	23,5 %	0,008	0,006	— 0,002	25 %
Phosphore minéral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chlorures (en NaCl)	0,247	0,233	— 0,014	5,7 %	0,388	0,345	— 0,042	10,8 %	0,074	0,074	0	0
Sulfates (en S)									0,204	0,147	— 0,057	28 %
Maximum des bacilles vivants (en mil- li ns)	4,530				2,833							1,113
Maximum des bacilles visibles (en mil- lions)	7,048				5,839							3,961

PEPTONE PANCRÉATIQUE DE CASÉINE N° 5					PEPTONE PEPSIQUE DE CASÉINE N° 10				
	Milieu stérile	Culture filtrée	Variation observée		Milieu stérile	Culture filtrée	Variation observée		
			Valeur absolue	Pourcentage			Valeur absolue	Pourcentage	
pH.....	7,4	7,8	+ 0,4		7,4	7,8	+ 0,4		
Tension superficielle, 5 cm ³	103 gttes	102	— 1		120	118	— 2		
Déviation polarimétrique	?	?			— 54°	— 40°	— 14°		
Azote total (en gr. par litre)	0,78	0,70	— 0,08	10 %	1,036	0,924	— 0,112	11 %	
Azote amino-ammoniacal	0,154	0,155	+ 0,001	0,6 %	0,084	0,113	+ 0,029	34,5 %	
Azote ammoniacal	0,046	0,056	+ 0,010	22 %	0,023	0,063	+ 0,040	174 %	
Azote aminé	0,108	0,099	— 0,009	8,5 %	0,061	0,050	— 0,011	18 %	
Azote formol	19	21			8	12			
Azote total									
Carbone.....	2,80	2,61	— 0,19	8,5 %	3,11	2,80	— 0,31	10 %	
Carbone	3,6	3,7			3	3			
Azote total.									
Phosphore total	0,110	0,070	— 0,040	37 %	0,061	0,040	— 0,021	34,5 %	
Phosphore organique	0,012	0,010	— 0,002	16,5 %	0,019	0,016	— 0,003	16 %	
Phosphore minéral	0,098	0,060	— 0,038	39 %	0,042	0,24	— 0,018	43 %	
Chlorures (en NaCl)	0,009	0,009	0	0	0,079	0,079	0	0	
Sulfates (en S)									
Maximum des bacilles vivants (en millions).....									4.266
Maximum des bacilles visibles (en millions)									6.976

3.550
8.837

Des résultats ainsi obtenus nous pouvons tirer un certain nombre de conclusions:

A. — Modifications provoquées par le métabolisme microbien

Sous l'influence de la multiplication du bacille pyocyanique les solutions dialysées des différentes peptones voient leur constitution se modifier de la façon suivante:

1° *pH*. — Toutes les cultures s'alcalinisent légèrement et leur pH atteint à peu près uniformément 7,8.

2° *Déviatiou polarimétrique*. — La mesure de la déviation polarimétrique n'a pas toujours pu être faite avec une grande précision par suite de la coloration des liquides. Cependant nous avons presque toujours pu constater une légère diminution de cette déviation.

3° *Tension superficielle*. — La tension superficielle augmente très légèrement sous l'influence de la multiplication bactérienne comme le montre la faible diminution du nombre des gouttes fournies par 5 cm³ de liquide.

4° *Composés azotés*. — Le bacille pyocyanique est un bacille protéolytique capable d'attaquer les substances albuminoïdes complexes et de les décomposer jusqu'au stade ammoniacque. Dans les milieux ne contenant pas de glucides (cas de nos solutions nutritives), le bacille empruntera le carbone nécessaire à son métabolisme aux peptones. Comme le bacille a besoin de plus de carbone que d'azote, il est obligé de transformer une grande quantité de matière organique et laisse, comme résidu, de l'ammoniacque.

Dans nos cultures l'azote total diminue nettement, les variations observées sont comprises entre 56 et 160 mgr. par litre et les diminutions ainsi constatées représentent de 8,5 à 17,5 % de l'azote total initial.

L'azote amino-ammoniacal ne varie pas ou augmente dans des proportions très diverses qui peuvent atteindre jusqu'à 57,5 % de la teneur initiale. Comme, d'autre part, la perte en

azote total est toujours notable, il en résulte que le rapport
Az. formol

est plus élevé dans les milieux ensemencés que
Az. total
dans les milieux stériles.

L'azote ammoniacal augmente toujours mais dans des proportions fort variables, les quantités d'azote ammoniacal formé passant de 10 mgr. par litre pour la peptone pancréatique de caséine N° 5 à 80 mgr. par litre pour la peptone peptique de viande N° 6.

L'azote aminé décroît constamment sans que l'importance des diminutions observées soit en rapport avec le nombre des germes formés.

Rappelons que différents auteurs parmi lesquels ARNAUD et CHARRIN (1), AUBEL (2), GORIS et LIOT (23), ont particulièrement étudié les variations de l'azote ammoniacal et de l'azote aminé dans les cultures de bacilles pyocyaniques.

Carbone. — Les milieux cultivés et filtrés renferment une quantité de carbone total nettement inférieure à celle des milieux stériles. Les diminutions observées sont relativement importantes et vont de 190 à 560 mgr. par litre. Les quantités de carbone disparues sont toujours plus grandes que les quantités d'azote total également éliminées. Le rapport
C. disparu

varie de 2,3 à 6,6.

Az. disparu

Phosphore. — Nos milieux stériles renfermaient des quantités fort variables de phosphore total (de 8 à 110 mgr. par litre). Il est intéressant de constater que la filtration à la bougie a éliminé d'autant plus de phosphore total que le milieu stérile en renfermait davantage, et que le rapport du phosphore disparu au phosphore initial est d'autant plus grand que le liquide primitif était plus riche en cet élément. Le phosphore éliminé provient principalement du phosphore minéral quand les milieux en renferment encore.

Chlore. — Dans la majorité des cas la quantité de chlore est la même pour les milieux stériles et pour les milieux cultivés. L'influence des chlorures sur la multiplication micro-

bienne est donc très faible comme l'avaient montré M. GUILLEMIN et M. P. LARSON (24). Nous pouvons d'ailleurs remarquer que les milieux synthétiques préconisés par E. AUBEL et A. LIOT pour la culture du bacille pyocyanique ne renferment pas de chlorures.

Sulfates. — Nos milieux renfermaient généralement trop peu de sulfates pour pouvoir procéder aux dosages de ces composés. Dans le seul cas où cette détermination a été possible, nous avons constaté que la multiplication microbienne avait fait disparaître 28 % des sulfates contenus dans le liquide de culture.

B. — L'intensité de la multiplication microbienne est-elle en relations simples avec la constitution des milieux

Les numérations antérieures nous ont montré que, si l'on excepte la peptone dialysée de muqueuse qui donne des résultats inférieurs, les autres peptones dialysées conviennent également bien au développement du bacille pyocyanique.

La faible valeur bactériologique de la peptone dialysée de muqueuse doit évidemment être rapprochée de la faible teneur de cette peptone en azote total, en azote aminé et surtout en carbone et en phosphore total. De même si la peptone de muqueuse ne donne naissance qu'à un nombre relativement faible de germes, les quantités d'azote total et de phosphore total éliminées par filtration à la bougie des milieux ensemencés, sont plus petites avec cette peptone que dans le cas général. Par contre tout en ne produisant qu'un assez petit nombre de bacilles, la peptone de muqueuse a vu disparaître pendant la culture une quantité d'azote aminé supérieure à celle qui a été utilisée dans les autres milieux. Le nombre des cellules formées n'est donc pas en rapport avec la quantité d'azote aminé métabolisé.

Enfin les méthodes d'analyse utilisées ne nous montrent

pas pourquoi la multiplication microbienne s'arrête à la vingt-quatrième heure de la culture. A ce moment les liquides ensemencés renferment encore, en solution, une forte proportion des principaux éléments dosés. La quantité d'azote total employée pour la formation du protoplasme bactérien ne représente en général que 10 % de l'azote total primitif, le carbone total n'a été utilisé que dans une proportion maximum de 20 %, il reste encore en solution de 64 à 80 % du phosphore total et de 34 à 92 % de l'azote aminé.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS DE CE DEUXIÈME CHAPITRE

Dans ce chapitre, après avoir indiqué deux méthodes de numération des germes contenus dans un milieu de culture liquide, nous avons utilisé ces techniques pour suivre la multiplication du bacille pyocyanique dans des solutions de diverses peptones et dans les mêmes solutions dialysées.

Les résultats obtenus nous ont montré que la multiplication du bacille pyocyanique s'effectue dans tous ces milieux suivant le même rythme général.

Le nombre des bacilles visibles commence à croître aussitôt après l'ensemencement. Il augmente rapidement jusqu'à l'obtention d'un maximum, situé généralement entre la vingt-quatrième heure et la trente-quatrième heure de la culture, puis décroît peu à peu.

Le nombre des bacilles capables de se reproduire sur milieu solidifié par la gélose n'augmente pas, ou très peu, pendant les deux ou trois premières heures de la culture. Pendant cette phase, désignée sous le nom de phase de latence par les différents auteurs, la division cellulaire ne donnerait donc naissance qu'à des individus fragiles incapables de supporter un transfert et de se reproduire dans un milieu différent de leur milieu originel. La multiplication des germes capables de se reproduire sur milieu gélosé commence ensuite

activement après cette période de latence, et le nombre de ces bacilles « résistants » se rapproche rapidement du nombre des bacilles visibles. Cette nouvelle phase d'accroissement logarithmique est assez brève, la multiplication se ralentit, les germes résistants atteignent leur maximum, soit en même temps, soit une dizaine d'heures avant les germes visibles, puis leur nombre commence à décroître.

Ces résultats confirment à nouveau les observations de J. RÉGNIER, R. DAVID et A. KAPLAN. Reprenant les conclusions de ces auteurs nous pouvons donc distinguer pendant l'évolution de la croissance microbienne trois périodes principales.

a) Une période de jeunesse coïncidant avec l'ancienne phase de latence. Il ne se forme alors que des organismes de vitalité limitée pour diverses causes peut-être identiques à celles qu'ont invoquées les auteurs pour expliquer cette phase de latence.

b) Une période de plein développement correspondant à la phase de multiplication logarithmique. C'est une période d'adolescence où prennent naissance des formes d'une plus grande vitalité capables de se multiplier dans des conditions plus difficiles.

c) Une période de vieillissement. En effet, dès la dixième heure la multiplication se ralentit, les formes vigoureuses disparaissent et le nombre des germes capables de se reproduire sur gélose rapidement diminue. Il se pourrait qu'alors les bacilles sécrètent des toxines nuisibles ou bien que le milieu s'appauvrisse en substances fondamentales ou principes moins connus mais nécessaires au développement (acide aminé, vitamines, etc...) ou bien encore que certains résidus viennent freiner la division cellulaire.

Les expériences que nous venons de rapporter nous ont encore montré que la plupart des peptones étudiées conviennent parfaitement à la multiplication du bacille pyocyanique et que les différences constatées dans les valeurs bactériologiques de certaines d'entre elles paraissent dépendre beaucoup plus de l'origine de ces peptones que du ferment employé pour leur préparation.

La dialyse, en éliminant une grande proportion des composés solubles contenus dans nos peptones, nous a permis d'obtenir des milieux de composition plus simple, donnant cependant dans la plupart des cas, des résultats peu inférieurs à ceux qui sont fournis par les solutions, plus complexes, des peptones ordinaires. Nous pouvons donc espérer qu'il nous sera possible d'obtenir de très bons résultats en additionnant les solutions ainsi simplifiées de quelques composés chimiques bien déterminés.

Enfin, les dosages chimiques que nous avons effectués comparativement sur les milieux stériles et sur les mêmes milieuxensemencés nous ont permis de préciser les transformations apportées à la constitution des liquides nutritifs par le développement microbien, transformations qui se marquent surtout par: une alcalinisation des milieux, une augmentation de la tension superficielle, une diminution de l'azote total, de l'azote aminé, du carbone, du phosphore et une formation d'azote ammoniacal.

CHAPITRE III

INFLUENCE DE L'ADDITION DE GLUCOSE ET D'UN MÉLANGE DE SELS SUR LA MULTIPLICATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS UNE EAU PEPTONÉE A 10⁰/₁₀₀ CHOISIE ET PRÉALABLEMENT DIALYSÉE

Les essais effectués au chapitre précédent nous ont montré que, dans la majorité des cas, le bacille pyocyanique se multiplie sensiblement avec la même intensité dans des solutions de peptones commerciales ou dans les mêmes solutions dialysées. Les eaux peptonées dialysées renferment donc en quantité suffisante, ces composés organiques complexes qui confèrent aux milieux naturels une supériorité marquée sur les milieux chimiquement définis. Nous allons rechercher maintenant s'il est possible d'augmenter la valeur bactériologique de ces milieux naturels ainsi simplifiés en leur ajoutant des composés définis.

Les recherches d'un grand nombre d'auteurs ont mis en évidence l'influence exercée d'une part par les hydrates de carbone et d'autre part par différents sels minéraux sur le croît microbien. D'un autre côté nous avons vu que la seule peptone dialysée (peptone de muqueuse) qui possède une valeur bactériologique inférieure ne renferme que des quantités relativement faibles de carbone total et de phosphore total. Nous chercherons donc à améliorer nos eaux peptonées dialysées en leur ajoutant d'une part du glucose et d'autre part un mélange salin particulièrement riche en phosphore. Avant de passer à nos essais personnels, nous rappellerons rapidement les principaux travaux se rapportant à cette question.

I. — INFLUENCE DU GLUCOSE SUR LA NUTRITION MICROBIENNE

De nombreux auteurs ont étudié l'influence du glucose sur le métabolisme microbien. Parmi les principaux travaux se rapportant à cette question nous retiendrons surtout ceux de M. STEPHENSON et de HELEN GLINKA TSCHERNORUTZKY.

M. STEPHENSON (58), en 1930, a d'abord examiné le rôle joué par les hydrates de carbone dans les phénomènes de désamination. Des expériences rapides l'ont conduit à admettre que le glucose était un élément plus rapidement utilisable que les matières albuminoïdes et que l'hydrate de carbone épargnait les protéiques. Un peu plus tard, le même auteur, en étudiant l'influence du glucose sur la production d'enzymes protéolytiques filtrables dans les milieux de culture, a noté que le glucose empêchait la formation des enzymes pendant toute la durée de sa fermentation. L'attaque des composés azotés était d'autant plus retardée que la concentration en glucose était plus élevée, elle pouvait même ne pas se produire si le taux de l'hydrate de carbone dépassait 3 %. Ces résultats ont été confirmés par KENDALL.

HELEN GLINKA TSCHERNORUTZKY, en 1930, après des essais faits avec le bacille mycoïdes montre que le glucose en solution à 0,1 % dans les milieux de culture, inhibe la formation d'ammoniaque. Elle ajoute que cette action du glucose n'est pas spécifique, car d'autres combinaisons carbonées ont la même action pourvu qu'elles soient facilement assimilées par les microbes et qu'elles constituent une bonne source alimentaire pour ces micro-organismes.

La même année (21), dans un travail se rapportant uniquement au glucose, elle passe en revue tous les auteurs qui ont déjà étudié la question et qui peuvent être classés en deux grands groupes:

1° Ceux qui comme JONES (32), BERMAN et RETTGER (4), SLA-

NETZ et RETTGER (56) cherchent la cause de l'économie d'albumine provoquée par la présence de glucose dans les modifications du pH du milieu de culture, modifications produites par la formation d'acides à partir du sucre.

2° Ceux qui comme WAKSMANN et LOMANITZ (61), KENDALL et FARMER (34), etc..., supposent que le glucose constitue une bonne source d'énergie pour les micro-organismes et rend par la superflue la décomposition de quantités plus grandes d'albumine.

Les expériences de WAKSMANN, effectuées avec des cultures microbiennes dans des milieux nutritifs ne renfermant qu'un seul acide aminé, sont en faveur du fait que la formation de l'ammoniaque ne dépend pas de la quantité absolue d'azote contenue dans le milieu initial, mais qu'elle est en relation avec les proportions de carbone et d'azote présentes dans le milieu de culture. D'après cet auteur la quantité d'ammoniaque produite pour chaque unité de substances décomposées est d'autant plus grande que le rapport du carbone à l'azote est plus faible.

BLAGOWESTSCHENSKI (6) a une opinion un peu particulière et croit que l'économie d'albumine produite par le glucose n'est pas due à une influence spécifique de l'hydrate de carbone, mais qu'il s'agit d'une action qui peut être provoquée encore par d'autres substances en concentration forte comme par exemple la glycérine et les sels neutres.

Pour HELEN GLINKA TSCHERNORUTZKY, le glucose ajouté aux milieux de culture agirait de deux façons:

1° Comme aliment et comme source d'énergie facilement accessible.

2° Comme agent influençant la réaction du milieu.

Ces deux facteurs agissent sur l'échange d'azote du bacille mycoïdes de la façon suivante:

Les petites quantités de glucose, de 0,01 à 0,05 %, augmentent faiblement la teneur en ammoniaque aussi bien dans les milieux qui contiennent du carbonate de calcium que dans ceux qui sont dépourvus de tampons. Il semble que de petites quantités d'hydrate de carbone, insuffisantes pour modifier

le pH du milieu, constituent cependant une bonne source d'énergie et stimulent le développement des micro-organismes, de fait il y a en même temps des quantités plus grandes d'albumine qui sont décomposées. Par contre une addition de glucose qui dépasse 0,1 % est toujours suivie d'une diminution de la formation d'ammoniaque, aussi bien avec que sans carbonate de calcium (avec du carbonate de calcium si le pH s'approche de la zone neutre). Cette diminution n'est donc pas en relation directe avec la concentration des ions H.

En même temps que cette diminution de la formation de l'ammoniaque, on observe une augmentation de la teneur en acides aminés, car ces acides aminés qui ne sont plus désaminés, s'accumulent dans le milieu.

II. — INFLUENCE DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX SUR LA CROISSANCE MICROBIENNE

Le rôle joué par différents sels ou par des éléments simples dans la multiplication microbienne a été souvent étudié. En ce qui concerne plus particulièrement le bacille pyocyanique nous rappellerons simplement les travaux suivants qui ont servi de base à nos recherches.

E. AUBEL (2), en reprenant le milieu employé par FROUIN et Mlle LEDEBT, montre que les éléments nécessaires à la multiplication du bacille pyocyanique sont : l'azote, le carbone, l'oxygène, l'hydrogène, le phosphore, le soufre et le potassium. Tandis que FROUIN pense que le magnésium n'est pas nécessaire à la multiplication de cette bactérie, E. AUBEL estime qu'il est indispensable, à l'état de traces, pour la formation de la pyocyanine et pour assurer un développement microbien normal.

A. LIOT (35) substitue le sodium au potassium employé par AUBEL et utilise un milieu constitué par du phosphate de sodium, du sulfate de magnésium et du succinate d'ammonium.

J. SUPNIEWSKI (59) emploie comme constante minérale, pour étudier la multiplication du bacille pyocyanique, un mélange de chlorure de sodium, de phosphate de potassium, de sulfate de magnésium et de chlorure de calcium.

AUBEL indique également que le nucléinate de sodium constitue une bonne source de phosphore pour cette même bactérie.

Ajoutons enfin que BRAUN et GOLDSCHMIDT (7), en 1927, considéraient que les sels minéraux et surtout les sels de magnésium et le soufre ne sont pas absolument indispensables pour la vie bactérienne, mais qu'ils exercent une action très favorable sur la croissance, et que H. GLINKA TSCHERNORUTZKY (22) emploie comme milieu de culture pour le bacille mycoïdes une solution de sulfate de magnésium, phosphate monoacide de potassium, chlorure de sodium, sulfate de fer, chlorure de calcium, sels ammoniacaux et glucose et qu'elle obtient des résultats satisfaisants.

III. — MODE OPERATOIRE UTILISÉ DANS NOS RECHERCHES

Pour pouvoir comparer utilement nos résultats et éviter des erreurs pouvant provenir d'une variation de notre souche microbienne, nous avonsensemencé à des intervalles aussi rapprochés que possible le bacille pyocyanique dans une solution de peptone ordinaire, dans la même solution dialysée et dans cette solution dialysée additionnée soit de glucose, soit d'une constante saline, soit à la fois de glucose et de cette constante saline.

Milieux de culture.

Nos milieux ont été obtenus de la façon suivante:

1° *Eau peptonée simple.*

Cette eau peptonée a été préparée de la façon habituelle en utilisant la peptone pepsique N° 6, peptone qui nous a tou-

jours donné de très bons résultats. Sa composition a été déterminée en utilisant les mêmes techniques que précédemment et les résultats trouvés sont identiques ou très voisins de ceux que nous avons obtenus antérieurement dans l'étude d'un autre lot du même milieu.

2° *Eau peptonée dialysée.*

La préparation de l'eau peptonée dialysée a été conduite suivant la technique exposée précédemment. Cependant, nous avons pu, en utilisant une membrane différente, pousser plus loin l'élimination des composés solubles et l'eau peptonée dialysée ainsi obtenue diffère de celle qui avait été étudiée par une teneur plus faible en azote aminé, en carbone total, en phosphore total, et surtout en chlorures. L'eau peptonée dialysée ainsi obtenue a été répartie à raison de 200 ou 400 cm³ dans des matras en pyrex de 500 ou de 1.000 cm³ qui ont été stérilisés en même temps à l'autoclave.

Un certain nombre de ces ballons serviront à la préparation des milieux suivants:

3° *Eau peptonée dialysée glucosée « à 2 % ».*

Pour mettre facilement en évidence l'influence des hydrates de carbone sur le métabolisme microbien nous avons ajouté à nos milieux environ 2 % de glucose. Nous étions ainsi largement au-dessus des quantités minima indiquées par HELEN GLINKA TSCHERNORUTZKY.

La stérilisation à l'autoclave de bouillon peptoné glucosé donnant naissance à des composés nuisibles à la vie des bactéries, ainsi que l'ont montré en particulier A. BERTHELOT, G. RAMON et Mlle AMOUREUX (5), nous avons préparé notre eau peptonée dialysée glucosée en ajoutant aseptiquement, aussitôt avant l'ensemencement, 5 cm³ exactement mesurés d'une solution stérile de glucose à 40. % par 100 cm³ d'eau peptonée dialysée employée.

Cette solution glucosée est obtenue de la façon suivante:

On prend: glucose pur anhydre, 40 grs; eau distillée q. s. pour 100 cm³.

On répartit en ampoules de verre de 10 cm³ et on stérilise pendant 20 minutes à 115°.

La teneur en glucose des ampoules stériles a été ensuite vérifiée en utilisant la technique de G. BERTRAND.

L'addition de 5 cm³ de solution glucosée pour 100 cm³ de liquide de culture augmente légèrement le volume du milieu employé. Nous avons tenu compte de la dilution ainsi réalisée et les proportions des différents éléments contenus dans l'eau peptonée dialysée glucosée ont été calculées en multi-

pliant par $\frac{100}{105}$ les proportions correspondantes détermi-

nées dans la solution dialysée simple. En particulier l'eau peptonée dialysée renferme pour 100 cm³ non pas exactement 2 grammes de glucose mais seulement 1 gr. 94 de ce composé.

La quantité de carbone apportée par le glucose a été obtenue en multipliant par 0,4 le poids du glucose introduit dans

$$100 \text{ cm}^3 \text{ de solution } \frac{6 \text{ C}}{\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6} \frac{72}{180} = 0,4.$$

4° Eau peptonée dialysée additionnée d'une constante saline.

Les quelques travaux que nous avons passé en revue au début de ce chapitre, nous ont montré que les éléments indispensables, ou tout au moins favorables, au développement du bacille pyocyanique sont le carbone, l'azote, l'oxygène, l'hydrogène, le phosphore, le soufre, le potassium, le sodium et le magnésium. Pour compenser l'élimination des composés minéraux solubles qui s'est produite pendant la dialyse, nous avons ajouté à notre solution dialysée une constante saline obtenue de la façon suivante:

On prend:

Chlorure de sodium	5 gr.
Chlorure de potassium	1 gr.
Nucléinate de sodium	1 gr.
Sulfate de magnésium cristallisé	1 gr.
Eau distillée q. s. p.	50 cm ³

On fait dissoudre en chauffant légèrement, on ajoute quelques gouttes de solution normale de soude pour obtenir un pH voisin de 7, on répartit en ampoules de 10 cm³ et on stérilise à l'autoclave pendant 20 minutes à 115°.

Cette solution est ajoutée aseptiquement à l'eau peptonée dialysée stérile, aussitôt avant l'ensemencement, à raison de 5 cm³ exactement mesurés pour 100 cm³ de milieu nutritif.

La composition du liquide ainsi obtenu sera déduite de celle de l'eau peptonée dialysée stérile en tenant compte, d'une part de la dilution ainsi réalisée, et d'autre part des éléments apportés par la solution saline elle-même. Des dosages effectués sur celle-ci après stérilisation nous ont montré que 50 cm³ de la solution saline renfermaient :

Azote total	0 gr. 154
Carbone total	0 gr. 45
Phosphore total	0 gr. 0929
Chlorures (en NaCl)	5 gr. 73

5° *Eau peptonée dialysée glucosée « à 2 % » et additionnée de la constante saline.*

Ce milieu est obtenu en ajoutant aseptiquement à l'eau peptonée dialysée 5 cm³ de la solution stérile de glucose à 40 % et 5 cm³ de la solution saline stérile pour 100 cm³ d'eau peptonée.

La composition du liquide ainsi obtenu est calculée en partant de celle de l'eau peptonée dialysée stérile et en tenant compte de la dilution ainsi effectuée et des éléments apportés par les deux solutions ajoutées.

Le tableau suivant résume la composition des milieux ainsi préparés. Les résultats sont toujours donnés en grammes par litre.

	Eau peptonée simple	Eau peptonée dialysée	Eau peptonée dialysée glucosée	Eau peptonée dialysée minéralisée	Eau peptonée dialysée glucosée minéralisée
pH	7,6	7,4			
Tension superficielle 5 cm ³ ..	115 gttes	110 gttes			
Déviatiou polacimétrique(l=1)	— 40'	— 28'			
Azote total (en gr. par litre) ...	1,344	0,896	0,853	1,00	0,954
Azote amino-ammoniacal	0,233	0,077	0,073	0,073	0,070
Azote ammoniacal	0,051	0,037	0,035	0,035	0,034
Azote aminé	0,182	0,040	0,038	0,038	0,036
Azote formol	17	8,5	8,5	7,5	7,5
Azote total					
Carbone total	4,90	2,08	9,59	2,41	9,57
Carbone du glucose			7,61		7,27
Carbone des peptones	4,90	2,08	1,98	1,98	1,89
Carbone des peptones et de la constante saline				2,41	2,30
Carbone total	3,6	2,3	11,3	2,4	10,1
Azote total					
Phosphore total	0,038	0,0064	0,0061	0,094	0,090
Phosphore organique	0,027	0,0064	0,0061	0,094	0,090
Phosphore minéral ..	0,011	0	0	0	0
Chlorures (en NaCl)	1,06	0,023	0,022	5,47	5,23

Ensemencement et culture.

Nos expériences ont été conduites de la façon habituelle. Les différents milieux, placés à l'étuve à 37°, ont étéensemencés à raison de 500.000 germes visibles par cm³. Des prélèvements successifs nous ont permis d'y suivre quantitativement l'évolution de la multiplication microbienne et les résultats ainsi obtenus nous ont permis d'apprécier la valeur bactériologique de ces différents liquides de culture. Enfin en comparant la composition des milieuxensemencés et filtrés sur bougie à la quarante-huitième heure de la culture, à celle des milieux initiaux stériles, nous verrons si l'intensité de la croissance microbienne est en relation simple avec la constitution des milieux de culture. Nous présenterons d'abord les chiffres obtenus dans l'étude numérique de la poussée microbienne puis nous examinerons les résultats fournis par les dosages chimiques.

IV. — MULTIPLICATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS L'EAU PEPTONÉE SIMPLE, DANS L'EAU PEPTONÉE DIALYSÉE ADDITIONNÉE DE GLUCOSE OU DE LA CONSTANTE SALINE

Toutes ces cultures ont évolué à peu près de façon identique.

Nous avons observé un louche à peine perceptible vers la quatrième ou la cinquième heure après l'ensemencement, ce louche s'est transformé en un trouble vers la septième ou huitième heure, et celui-ci s'est accentué jusqu'à la fin de l'opération. A part la peptone commerciale qui a présenté entre la vingt-quatrième et la quarante-huitième heure un voile et une fluorescence verte, nous n'avons observé ni voile ni fluorescence dans aucun de ces autres cas.

Comme nous l'avons déjà fait dans le chapitre précédent, nous avons rassemblé dans les tableaux suivants les résultats obtenus dans les différents essais.

PEPTONE PEPSIQUE N° 6

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699	88' 70' 152' 539'	366.000	5,563	357'
2 heures 30'..	1.730.000	6,238		490.000	5,690	63'
7 heures 30'..	34.444.000	7,537		13.000.000	7,114	143'
24 heures	3.184.000.000	9,503		1.630.000.000	9,212	960'
32 heures	5.902.000.000	9,771		2.400.000.000	9,380	
48 heures	3.029.000.000	9,481		1.833.000.000	9,263	

PEPTONE N° 6 DIALYSÉE

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699	100' 73' 184' 240'	460.000	5,663	∞
2 heures	1.210.000	6,083		396.000	5,598	75'
8 heures	36.450.000	7,562		11.330.000	7,054	188'
24 heures	1.385.000.000	9,141		400.000.000	8,602	257'
30 heures	4.189.000.000	9,622		1.100.000.000	9,041	
48 heures	3.227.000.000	9,509		1.300.000.000	9,114	
3 jours	2.053.000.000	9,312		1.100.000.000	9,041	

PEPTONE N° 6 DIALYSÉE GLUCOSÉE

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	296.000	300.000
2 heures	2.700.000	2.871.000	356.000	383.000
8 heures	56.120.000	54.660.000	12.300.000	13.600.000
24 heures	7.986.000.000	7.738.000.000	2.466.000.000	2.300.000.000
32 heures	3.092.000.000	2.683.000.000	1.000.000.000	833.000.000
48 heures	1.453.000.000	1.306.000.000	500.000.000	500.000.000

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699		298.000	5,474	
2 heures	2.785.500	6,445	50'	369.500	5,568	400'
8 heures	55.380.000	7,743	83'	12.950.000	7,112	70'
24 heures	7.862.000.000	9,895	135'	2.383.000.000	9,377	128'
32 heures	2.887.000.000	9,460		916.000.000	8,962	
48 heures	1.379.000.000	9,140		500.000.000	8,699	

PEPTONE N° 6 DIALYSÉE MINÉRALISÉE

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉSISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	336.000	423.000
2 heures	6.360.000	7.780.000	370.000	440.000
8 heures	60.430.000	57.450.000	9.000.000	7.600.000
24 heures	14.650.000.000	13.800.000.000	3.733.000.000	3.233.000.000
32 heures	4.141.000.000	3.693.000.000	1.733.000.000	1.866.000.000
48 heures	2.195.000.000	2.625.000.000	1.400.000.000	1.033.000.000

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉSISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699	} 31' 120' 121'	379.000	5,579	} 1333' 83' 110'
2 heures	7.070.000	6,849		405.000	5,607	
8 heures	58.940.000	7,770		8.300.000	6,920	
24 heures	14.225.000.000	10,153		3.483.000.000	9,542	
32 heures	3.917.000.000	9,593		1.800.000.000	9,276	
48 heures	2.410.000.000	9,383		1.217.000.000	9,126	

PEPTONE N° 6 DIALYSÉE GLUCOSÉE, ET MINÉRALISÉE

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES RÉISTANTS	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0.....	500.000	500.000	206.000	220.000
2 heures	3.470.000	4.100.000	273.000	246.000
8 heures	47.700.000	63.600.000	12.000.000	12.333.000
24 heures	11.883.000.000	12.840.000.000	3.500.000.000	3.130.000.000
30 heures	5.097.000.000	6.069.000.000	2.100.000.000	2.066.000.000
48 heures	2.553.000.000	3.057.000.000	1.300.000.000	1.100.000.000

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES RÉISTANTS		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de géné- ration entre 2 périodes
0.....	500.000	5,699	41' 94' 124'	213.000	5,328	428'
2 heures	3.785.000	6,578		259.500	5,414	65'
8 heures	55.650.000	7,745		12.166.500	7,085	120'
24 heures	12.361.500.000	10,092		3.315.000.000	9,520	
30 heures	5.583.000.000	9,747		2.083.000.000	9,319	
48 heures	2.805.000.000	9,448		1.200.000.000	9,079	

L'examen de ces tableaux nous montre que dans ces milieux, comme dans tous ceux que nous avons déjà étudiés, la multiplication du bacille pyocyanique s'effectue suivant le même rythme général. Nous ne reviendrons donc pas sur l'allure générale de ce phénomène et sur les différences constatées entre la multiplication des germes visibles et celle des germes capables de se reproduire sur gélose.

La tableau suivant, dans lequel nous avons rassemblé les principaux résultats trouvés, nous permettra d'apprécier facilement la valeur bactériologique de nos solutions peptonées.

TEMPS DE GÉNÉRATION

PENDANT :

Phase dite de latence (0 à 2 heures)

Phase dite de multiplication logarithmique :

(2 heures à 8 heures)

Phase de multiplication ralentie :

1) 8 heures à 24 heures

2) 24 heures à 32 heures

HEURE DU MAXIMUM

VALEUR DU MAXIMUM (en mil-

lions)

Intervalle avec le maximum des résistants ...

Maximum visibles

Maximum des résistants

	MICROBES VISIBLES				MICROBES RÉSISTANTS			
	Peptone pure	Peptone dialysée	Peptone dialysée glucosée	Peptone dialysée minéralisée	Peptone pure	Peptone dialysée	Peptone dialysée glucosée	Peptone dialysée minéralisée
TEMPS DE GÉNÉRATION								
PENDANT :								
Phase dite de latence (0 à 2 heures)	88'	100'	50'	31'	41'	357'	400'	1.333'
Phase dite de multiplication logarithmique : (2 heures à 8 heures)	70'	73'	83'	120'	94'	63'	70'	83'
Phase de multiplication ralentie :								
1) 8 heures à 24 heures	152'	184'	135'	121'	124'	143'	128'	110'
2) 24 heures à 32 heures	539'	240'			24 h.	960'	257'	
HEURE DU MAXIMUM	32 h.	30 h.	24 h.	24 h.	24 h.	32 h.	24 h.	24 h.
VALEUR DU MAXIMUM (en mil- lions)	5,902	4,189	7,862	14,225	12,361	2,400	2,383	3,483
Intervalle avec le maximum des résistants ...	0	0	0	0	0			
Maximum visibles	2,4	3,2	3,3	4	3,7			
Maximum des résistants								

L'eau peptonée dialysée donne des résultats toujours inférieurs à ceux qui sont fournis par l'eau peptonée ordinaire. A partir de l'ensemencement jusqu'à la vingt-quatrième heure de la culture, les temps de génération des bacilles visibles et des bacilles « résistants » sont toujours plus grands dans l'eau peptonée dialysée que dans l'eau peptonée normale. De même les maxima des germes visibles et surtout des germes résistants sont plus élevés avec la peptone non purifiée.

Par contre l'eau peptonée dialysée additionnée soit de glucose, soit du mélange salin, soit du mélange de ces deux adjuvants, donne des résultats parfois égaux, presque toujours très nettement supérieurs à ceux qui sont observés avec l'eau peptonée ordinaire. L'eau peptonée dialysée, ainsi « améliorée » possède donc une valeur bactériologique égale ou supérieure à celle de l'eau peptonée simple.

La comparaison des chiffres obtenus nous montre que la multiplication des bacilles visibles est beaucoup plus rapide, pendant les deux premières heures de la culture, dans les solutions dialysées « améliorées » que dans les autres milieux. Pendant la phase de multiplication logarithmique (de la deuxième à la huitième heure) les temps de génération des bacilles visibles sont un peu plus grands dans les eaux peptonées dialysées « améliorées » que dans les solutions de peptone simple, mais, pendant la phase de multiplication ralentie le phénomène inverse se produit. Il en résulte que le maximum des germes visibles est plus élevé et se produit cependant plus rapidement dans les milieux additionnés de glucose ou de constante saline que dans l'eau peptonée simple ou dans l'eau peptonée dialysée.

La multiplication des bacilles « résistants » un peu moins rapide pendant la phase de multiplication logarithmique dans les eaux peptonées « améliorées » que dans l'eau peptonée ordinaire, conserve pendant la phase de multiplication ralentie une vitesse plus grande dans les premiers milieux. Le maximum des germes résistants se produit plus rapidement dans les solutions dialysées « améliorées » que dans l'eau peptonée simple. Il est en général plus élevé dans les

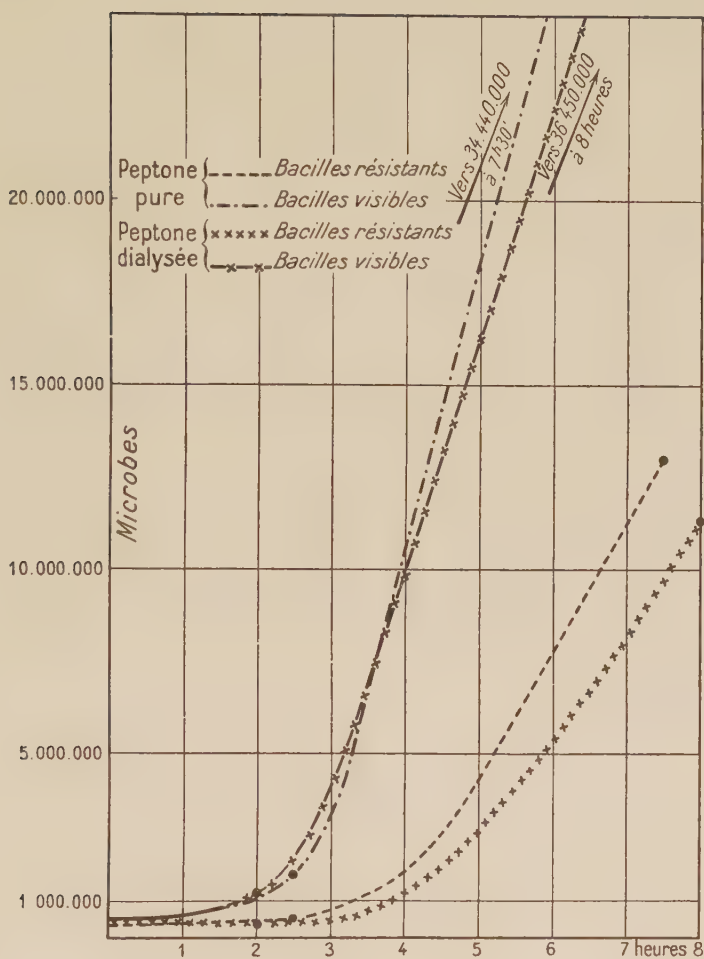
premiers milieux que dans le second. Seule l'eau peptonée dialysée glucosée donne un chiffre comparable à celui de l'eau peptonée ordinaire.

En résumé si la dialyse, en éliminant une proportion importante de composés solubles plus ou moins définis, diminue sensiblement la valeur bactériologique de l'eau peptonée N° 6, il est possible, en ajoutant à cette eau peptonée dialysée des composés chimiques définis, d'obtenir un nouveau milieu donnant des résultats parfois sensiblement égaux mais souvent nettement supérieurs à ceux de l'eau peptonée primitive.

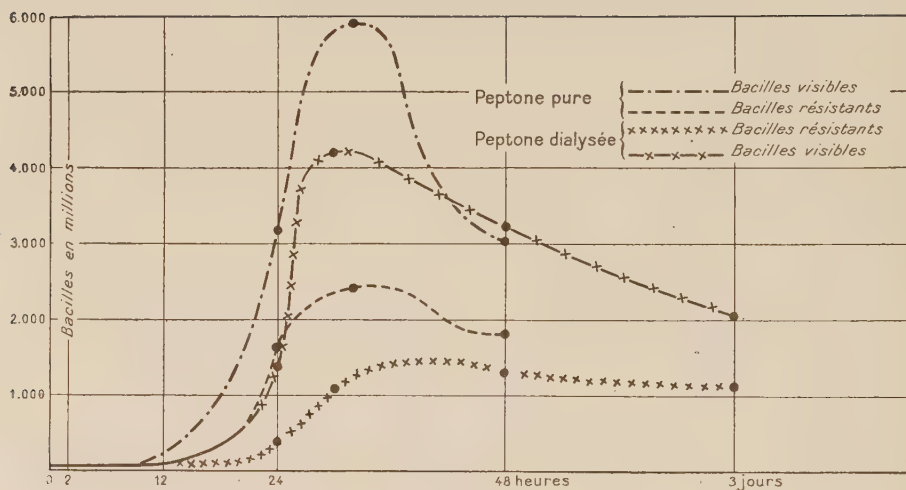
Le glucose seul ne permet pas d'obtenir des nombres de germes aussi élevés que la constante saline. Enfin l'addition de glucose et de constante saline donne, au point de vue du nombre des germes formés, des résultats plutôt inférieurs à ceux qui sont fournis par la seule addition de cette constante. Tout se passe comme si la division microbienne ne pouvait pas dépasser un certain chiffre, celui-ci étant atteint par la seule addition du mélange salin.

L'ensemble de ces résultats ressort également de l'examen des courbes suivantes. Les courbes ordinaires montrent bien les variations dans les valeurs des maxima obtenus et dans l'heure de leur formation. L'examen des courbes logarithmiques et la comparaison des pentes des portions comprises entre l'ensemencement et la vingt-quatrième heure de la culture fait ressortir les différences de vitesse présentées par la multiplication microbienne dans les différents milieux suivant les différentes phases du croît microbien.

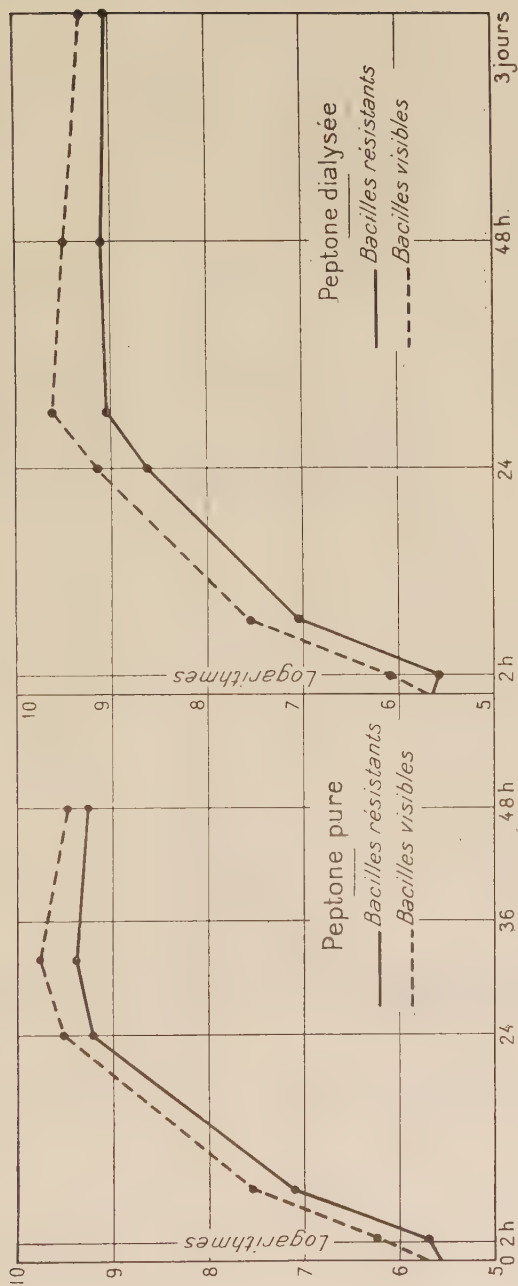
Ainsi pendant la phase dite de latence avec les germes visibles nous avons noté des pentes très rapides de 0 à 2 heures avec les peptones « améliorées », pentes beaucoup plus rapides qu'avec les peptones commerciales et dialysées. Pendant la phase dite de multiplication logarithmique, de 2 à 8 heures, les courbes présentent une pente un peu moins rapide avec ces milieux « améliorés » que dans les autres cas; par contre pendant la phase de multiplication ralentie le phénomène inverse se produit.



COURBE XXV. — Multiplication du bacille pyocyaneus pendant les premières heures de la culture.

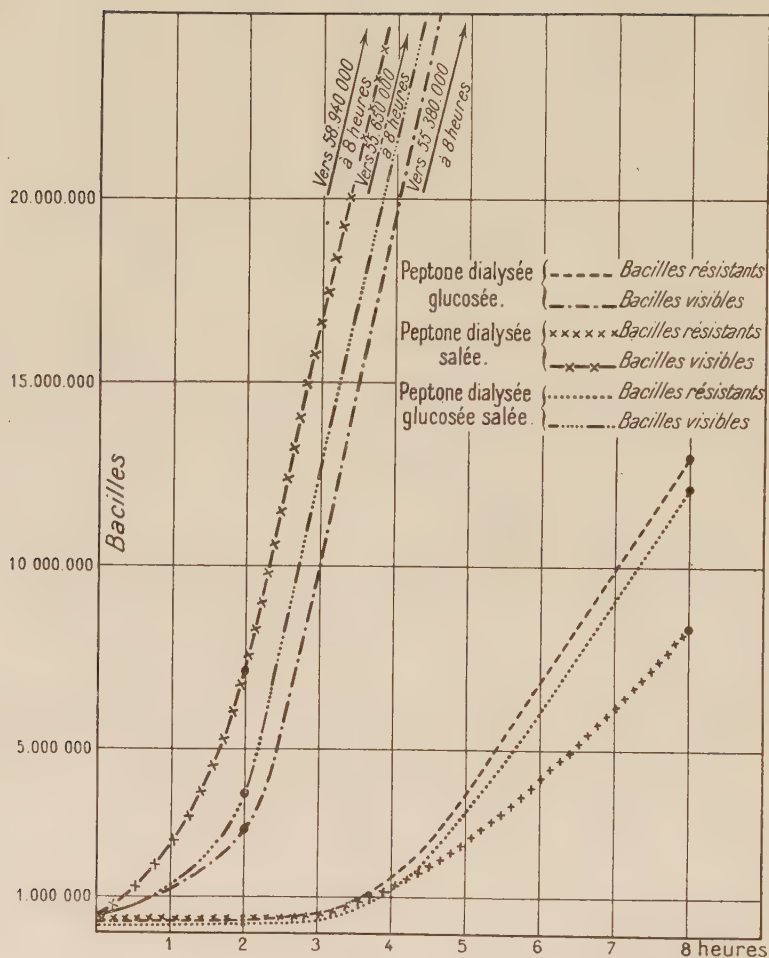


COURBE XXVI. — Multiplication du bacille pyocyaneus pendant l'évolution de la culture.

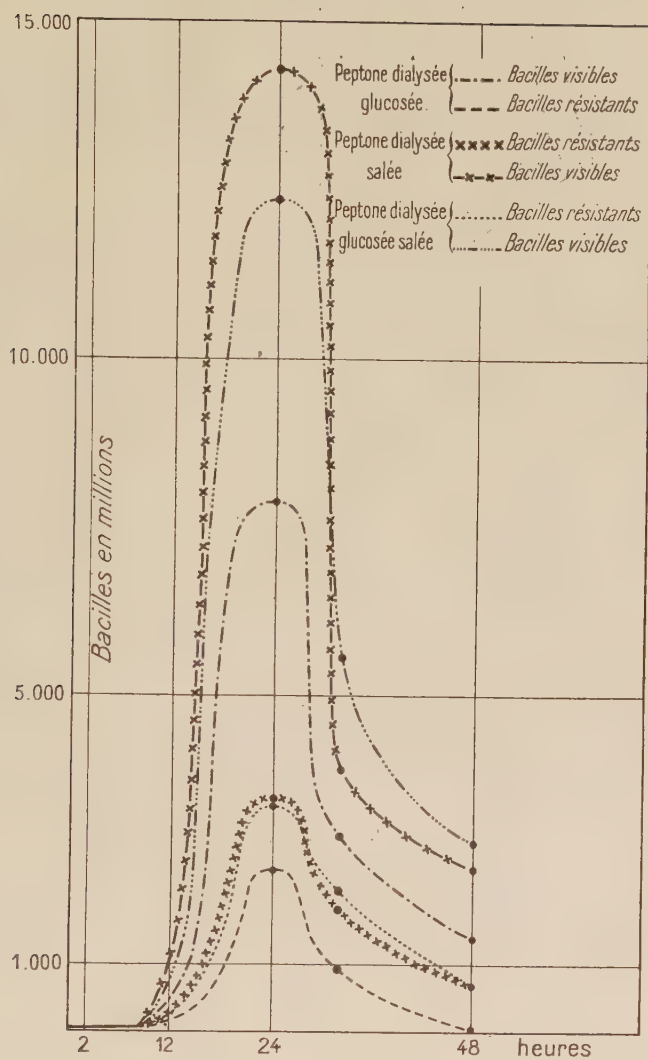


COURBE XXVII. — Multiplication du bacille pyocyaneus dans la peptone pure et dans la même peptone dialysée.

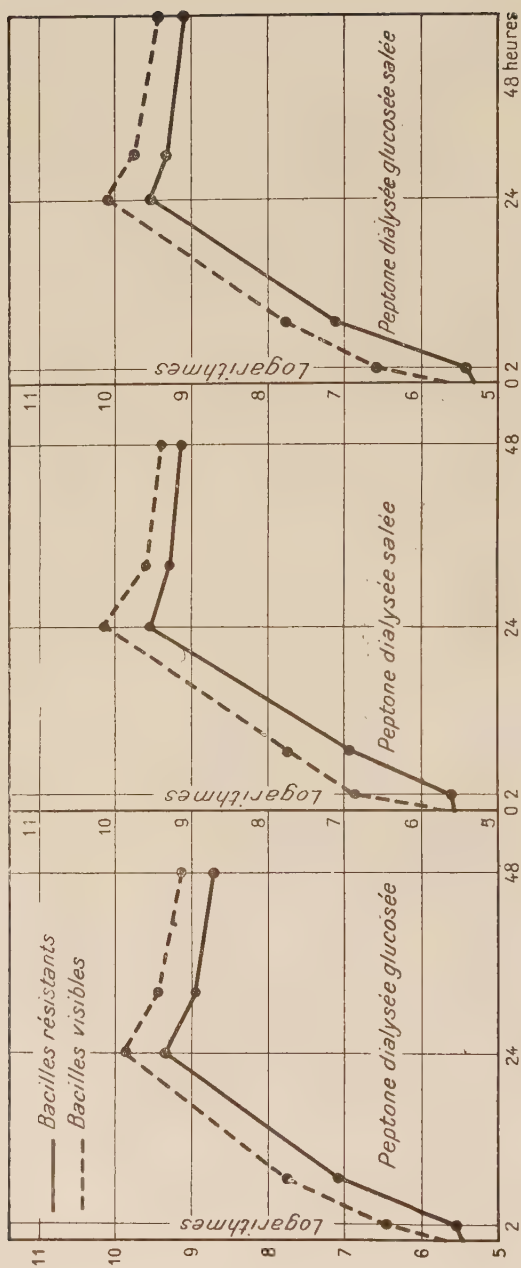
Variations des logarithmes des nombres microbiens en fonction de l'âge de la culture.



COURBE XXVIII. — Multiplication du bacille pyocyaneus pendant les premières heures de la culture.



COURBE XXIX. — Multiplication du bacille pyocyaneus pendant l'évolution de la culture.



COURBE XXX. — Multiplication du bacille pyocyanique dans les milieux suivants: peptone dialysée glucosée, peptone dialysée salée, peptone dialysée glucosée salée.

Variation des logarithmes des nombres microbiens en fonction de l'âge de la culture.

V. — MODIFICATION DE LA COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE SOUS L'INFLUENCE DE LA MULTIPLICATION DU BACILLE PYOCYANIQUE

Comme nous l'avons déjà indiqué dans le chapitre précédent nous avons comparé la composition des milieux stériles à celle des mêmes milieux, ensemencés et débarrassés des corps microbiens à la quarante-huitième heure de la culture. Les ensemencements ont toujours été faits à raison de 500.000 germes visibles par cm^3 en opérant sur des matras de 1 litre et de 500 cm^3 renfermant 400 et 200 cm^3 d'eau peptonée. Des prélèvements successifs nous ont permis de suivre constamment l'évolution de la poussée microbienne, de sorte que nous pourrions comparer l'intensité des variations observées dans la composition des différents milieux au nombre des germes formés. Enfin la filtration à la bougie et l'analyse des liquides ensemencés ont toujours été effectués avec les précautions que nous avons déjà indiquées. Nous avons en outre dosé le glucose restant en solution dans les milieux glucosés ensemencés en utilisant la technique de G. BERTRAND et en opérant sur le liquide préalablement déféqué au réactif de PATEIN. De plus le dosage des chlorures, dans les eaux peptonées additionnées de la constante saline, a été effectué par la méthode de CHARPENTIER-VOLHARD.

Tous les résultats obtenus dans nos essais sont donnés dans les tableaux suivants. Nous y indiquons en même temps les nombres maxima des germes formés.

	EAU PEPTONÉE dialysée glucosée				EAU PEPTONÉE dialysée minéralisée				EAU PEPTONÉE dialysée, glucosée, minéralisée			
	Milieu stérile	Culture filtrée	Valeur absolue	Pour- centage	Milieu stérile	Culture filtrée	Valeur absolue	Pour- centage	Milieu stérile	Culture filtrée	Valeur absolue	Pour- centage
pH		7,3 103 + 36'				7,6 108 — 45'				7,0 107 + 28'		
Tension superficielle 5 cm ³												
Déviation polarimétrique (l = 1)												
Azote total (en gr. par litre)	0,853	0,644	— 0,21	24,3 %	1,00	0,728	— 0,272	27 %	0,954	0,769	— 0,185	19 %
Azote amino-ammoniacal	0,073	0,085	+ 0,012	16,5 %	0,073	0,113	+ 0,040	53 %	0,070	0,075	+ 0,005	7 %
Azote ammoniacal	0,035	0,056	+ 0,021	60 %	0,035	0,084	+ 0,049	129 %	0,034	0,048	+ 0,014	41 %
Azote aminé	0,038	0,029	— 0,009	24 %	0,038	0,029	— 0,009	24 %	0,036	0,027	— 0,009	25 %
Azote formol	8,5	13			7,5	15,5			7,5	9,5		
Azote total												
Carbone total	9,59	7,60	— 1,99	21 %	2,41	1,56	— 0,85	35,2 %	9,57	8,11	— 1,46	15 %
Carbone du glucose	7,61	5,84	— 1,77	23 %					7,27	6,60	— 0,67	9 %
Carbone des peptones	1,98	1,76	— 0,22	11 %								
Carbone des peptones et de la cons- tance saline					2,41	1,56	— 0,85	35 %	2,30	1,51	— 0,79	34 %
Carbone total	11,3	11,7			2,4	2,1			10,1	10,6		
Azote total												
Carbone total disparu			10				3,1				8,5	
Azote total disparu												
Phosphore total	0,0061	0,0056	— 0,0005	8 %	0,004	0,040	— 0,054	57,5 %	0,090	0,051	— 0,039	43,5 %
Phosphore organique	0,0061	0,0056	— 0,0005	8 %	0,004	0,040	— 0,054	57,5 %	0,090	0,051	— 0,039	43,5 %
Phosphore minéral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chlorures (en NaCl)	0,022	0,022	0	0	5,47	5,44	0,03	0,5 %	5,23	5,20	— 0,03	0,5 %
Maximum des bacilles visibles (en mil- lions)		7,862				14,225				12,361		
Maximum des bacilles vivants (en mil- lions)		2,383				3,483				3,315		

	Milieu stérile	Culture filtrée	Variation observée		Milieu stérile	Culture filtrée	Variation observée	
			Valeur absolue	Pourcentage			Valeur absolue	Pourcentage
pH.....	7,6	8,0	+ 0,4		7,4	7,8	+ 0,4	
Tension superficielle, 5 cm ³	115	101	- 14		110	105	- 5	
Déviati on polarimétrique (l = 1)	- 40'	- 28'	- 12'		- 28'	- 24'	- 4'	
Azote total (en gr. par litre)	1,344	1,092	- 0,25	18,5 %	0,896	0,728	- 0,168	19 %
Azote amino-ammoniacal	0,233	0,296	+ 0,063	27 %	0,077	0,098	+ 0,021	27,5 %
Azote ammoniacal	0,051	0,224	+ 0,173	339 %	0,037	0,063	+ 0,026	70 %
Azote aminé	0,182	0,072	- 0,110	60 %	0,040	0,035	- 0,005	12,5 %
Azote formol								
Azote total	17	27			8,5	13,5		
Carbone total	4,90	2,62	- 2,28	46,5 %	2,08	1,71	- 0,37	18 %
Carbone du glucose								
Carbone des peptones	4,90	2,62	- 2,28	46,5 %	2,08	1,71	- 0,37	18 %
Carbone des peptones et de la constante saline :								
Carbone total	3,6	2,4			2,3	2,3		
Azote total								
Carbone total disparu								
Azote total disparu								
Phosphore total	0,038	0,012	- 0,026	68,5 %	0,0064	0,0048	- 0,0016	26 %
Phosphore organique	0,027	0,007	- 0,020	74 %	0,0064	0,0048	- 0,0016	26 %
Phosphore minéral	0,011	0,005	- 0,006	54,5 %	0	0	0	0
Chlorures (en NaCl)	1,06	1,06	0	0	0,023	0,023	0	0
Maximum des bacilles visibles (en millions)		5,902				4,189		
Maximum des bacilles vivants (en millions)		2,400				1,300		

Nous retrouvons ici des variations du même ordre que celles que nous avons déjà signalées avec cependant quelques modifications dues à la présence du glucose.

La croissance microbienne provoque l'alcalinisation des milieux ordinaires (eau peptonée simple, eau peptonée dialysée, eau peptonée dialysée additionnée de constante saline), mais elle ne modifie pas ou même diminue légèrement le pH des milieux glucosés.

La quantité d'azote total éliminée par la filtration des milieuxensemencés représente de 18,5 à 27 % de l'azote total initial. Ces proportions sont plus élevées que celles que nous avons observées dans l'étude des différentes peptones dialysées. Elles atteignent leur maximum avec les peptones dialysées améliorées qui fournissent en même temps une récolte abondante.

L'azote amino-ammoniacal et l'azote ammoniacal augmentent sous l'influence de la croissance microbienne. La quantité d'azote ammoniacal formée, nettement plus grande avec l'eau peptonée ordinaire qu'avec les milieux dialysés, est encore diminuée lorsque ceux-ci renferment du glucose.

L'azote aminé diminue dans les milieux de culture pendant la multiplication microbienne. Cette diminution est particulièrement importante avec l'eau peptonée simple où l'azote aminé disparu représente 60 % de l'azote aminé initial.

Le développement microbien fait perdre aux milieux de culture des quantités très variables de carbone total. Les diminutions observées représentent de 15 à 46,5 % du carbone total initial. Les pertes en carbone sont particulièrement importantes avec l'eau peptonée simple et avec les solutions glucosées.

Le taux du phosphore total a toujours été abaissé par la poussée microbienne. Les quantités disparues sont excessivement variables et sont d'autant plus grandes que le milieu initial est plus riche en phosphore.

Enfin la teneur en chlorures des milieux de culture n'est pratiquement pas influencée par le développement des bactéries.

Les résultats que nous venons de passer en revue traduisent l'ensemble des modifications survenues dans la composition des milieux de culture pendant la période active de la multiplication microbienne. Il est évident que nous pourrions tirer des indications plus précises de nos essais si nous tenons compte en même temps du nombre des germes formés.

Le tableau suivant donne, pour les principaux éléments, les variations provoquées par la formation de 1 milliard de germes. Ces chiffres ont été obtenus en divisant les modifications décelées par les dosages par le nombre maximum des germes obtenus. Si les résultats diffèrent en valeur absolue suivant que l'on considère les bacilles visibles ou les bacilles résistants, les conclusions ne varient pas sensiblement suivant que l'on s'adresse à telle ou telle catégorie de germes.

VARIATIONS PROVOQUÉES PAR LA FORMATION DE 1 MILLIARD DE GERMES

	MICROBES VISIBLES				MICROBES RÉISTANTS				
	Eau peptonée simple	Eau peptonée dialysée	Eau peptonée dialysée glucosée	Eau peptonée dialysée minéralisée glucosée	Eau peptonée simple	Eau peptonée dialysée glucosée	Eau peptonée dialysée minéralisée	Eau peptonée dialysée minéralisée glucosée	
Azote total.....	0,042	0,040	0,027	0,019	0,105	0,129	0,085	0,114	
Azote ammoniacal.....	0,029	0,006	0,003	0,003	0,072	0,020	0,015	0,005	
Azote aminé.....	0,018	0,001	0,001	0,0006	0,045	0,003	0,0027	0,0028	
Carbone total.....	0,386	0,088	0,258	0,061	0,950	0,284	0,262	0,456	
Carbone du glucose.....		0,230		0,060		0,769		0,209	
Carbone des peptones et de la constante saline	0,386	0,088	0,028	0,061	0,950	0,284	0,262	0,247	
Phosphore total.....	0,004	0,0003	0,00006	0,0039	0,010	0,001	0,016	0,012	
Carbone disparu	9,1	2,2	9,5	3,2	9,0	2,3	9,5	4	
Azote disparu				4,3			3,1		

L'examen de ces résultats nous montre que les modifications provoquées dans la constitution des milieux de culture par la formation d'un même nombre de germe présentent des valeurs fort différentes suivant la nature des liquidesensemencés. Suivant la nature et la quantité des éléments offerts, le bacille s'adapte au milieu dans lequel il est ensemencé et il est vraisemblable que la composition de la cellule bactérienne sera modifiée en conséquence. Nous constatons par exemple que quand la teneur en phosphore total du milieu initial passe de 0 gr. 0061 (eau peptonée dialysée glucosée) à 0 gr. 0945 par litre (eau peptonée dialysée additionnée de la constante saline) la quantité de phosphore total éliminée par filtration à la bougie et correspondant à la formation de 1 milliard de germes vivants croît de 0 gr. 0002 à 0 gr. 016. Rappelons à ce propos que d'après M. GUILLEMIN (24) et M. P. LARSON, les phosphates se rencontrent à la fois, en forte quantité, dans les *sels libres* et dans les *sels fixes* contenus dans le protoplasme microbien. Pour ces auteurs les sels libres diffusent au dehors des bactéries tuées et leur proportion varie avec la composition du milieu de culture, les sels fixes, au contraire, ne diffusent pas en dehors de la cellule et leur proportion reste relativement constante pour une espèce bactérienne donnée.

D'une façon générale, c'est dans la constitution chimique de l'eau peptonée ordinaire que la multiplication microbienne provoque les changements les plus importants. Si nous passons successivement en revue les variations produites, pour chaque élément dosé, par la formation de un milliard de germes nous constatons que :

la quantité d'azote total éliminé est beaucoup plus grande, dans le cas des bacilles visibles, avec l'eau peptonée ordinaire et l'eau peptonée dialysée qu'avec les solutions dialysées « améliorées ». Les différences sont moins importantes si nous considérons le cas des bacilles dits « résistants ».

La proportion d'azote ammoniacal formé est beaucoup plus importante avec l'eau peptonée simple qu'avec les autres milieux. L'addition de glucose aux solutions dialysées diminue encore cette formation surtout si l'on considère plus particulièrement la catégorie des germes dits « résistants ».

L'azote aminé disparaît surtout avec l'eau peptonée ordinaire. L'addition de glucose ne semble pas modifier la quantité d'azote aminé consommé dans les solutions dialysées.

La quantité de carbone total disparue des liquides de culture est encore plus grande dans le cas de l'eau peptonée simple que dans le cas des milieux dialysés. L'addition de glucose augmente la proportion du carbone disparu et diminue parfois d'une façon importante la quantité de carbone empruntée aux peptones.

Enfin comme nous l'avons d'ailleurs déjà signalé au chapitre précédent, le phosphore total enlevé aux liquides de culture croît avec la teneur en phosphore des milieux initiaux.

Ces résultats sont conformes aux conclusions de Helen GLINKA TSCHERNORUTZKY (21) en ce qui concerne l'influence du glucose sur la production d'ammoniaque. Nous constatons par exemple que tandis que la formation de 1 milliard de germes « résistants » entraîne, pour l'eau peptonée dialysée, la production de 0 gr. 020 d'azote ammoniacal par litre, cette quantité est ramenée à 0 gr. 009 pour l'eau peptonée dialysée glucosée et à 0 gr. 004 pour l'eau peptonée dialysée additionnée de glucose et de constante saline. Par contre l'addition de glucose semble à peu près sans importance sur l'utilisation de l'azote aminé.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION DE CE TROISIÈME CHAPITRE

Dans ce chapitre nous avons comparé la multiplication du bacille pyocyanique dans une solution de peptone ordinaire, dans la même solution dialysée et dans cette solution dialysée additionnée soit de glucose, soit d'une constante saline, soit d'un mélange de glucose et de cette constante saline. Nous voulions nous rendre compte s'il était possible d'augmenter la valeur bactériologique des solutions de peptones dialysées en leur ajoutant des composés chimiques définis. La constante

saline renfermait en solution un mélange de chlorure de sodium, de chlorure de potassium, de sulfate de magnésium et de nucléinate de sodium et apportait ainsi dans le milieu les éléments minéraux considérés comme indispensables ou tout au moins favorables à la reproduction du bacille pyocyanique.

La multiplication du bacille pyocyanique s'effectue dans tous ces milieux suivant le rythme général que nous avons décrit au chapitre précédent, en particulier la multiplication des germes visibles commence aussitôt après l'ensemencement tandis que celle des germes capables de se reproduire sur milieu gélosé ne s'effectue qu'après une phase de latence bien définie.

Tous les milieux expérimentés permettent un bon développement du bacille pyocyanique. L'eau peptonée dialysée donne des résultats légèrement inférieurs à ceux qui sont fournis par l'eau peptonée ordinaire, par contre, la même solution dialysée additionnée soit de glucose, soit de la constante saline, soit de l'ensemble de ces composés donne des résultats, parfois égaux, presque toujours très nettement supérieurs à ceux qui sont observés avec l'eau peptonée normale. Il est donc possible, en partant d'un milieu naturel, simple, privé par la dialyse d'une grande partie des composés solubles qu'il renferme, d'obtenir un liquide de culture permettant une excellente multiplication microbienne.

Si l'addition de composés convenablement choisis augmente la valeur bactériologique de la solution de peptone dialysée, il semble cependant que le développement microbien ne peut pas dépasser une certaine limite. Le nombre des germes fournis n'est pas plus grand dans l'eau peptonée dialysée additionnée de glucose et de constante saline que dans la même eau peptonée renfermant simplement le mélange salin.

L'étude des modifications de la constitution de ces mêmes milieux de culture sous l'influence de la multiplication du bacille pyocyanique nous ont fait retrouver des variations de même ordre que celles que nous avons déjà signalées au chapitre précédent avec quelques modifications dues à la présence du glucose. En effet dans les milieux de culture ordi-

naires la croissance microbienne provoque une alcalinisation du liquide et augmente le taux de l'azote ammoniacal. Dans les eaux peptonées glucosées, au contraire, le pH n'augmente pas ou même diminue légèrement, et la quantité d'azote ammoniacal formé est nettement inférieure à celle qui prend naissance dans les autres milieux. La présence du glucose augmente la quantité de carbone utilisé pour la croissance du bacille pyocyanique et diminue parfois d'une façon importante la proportion de carbone emprunté aux peptones.

La multiplication bactérienne a provoqué des modifications chimiques dont la grandeur varie d'un milieu à l'autre ; en général c'est dans la composition de l'eau peptonée pure que nous avons noté les variations les plus importantes.

Nous pensons que suivant la nature et la quantité des éléments offerts, le bacille s'adapte au milieu dans lequel il est ensemencé et il est vraisemblable que la composition de la cellule bactérienne sera modifiée en conséquence.

CONCLUSION

Dans notre travail nous n'avons pas été uniquement dirigés, comme la plupart des autres auteurs, par le désir de préparer des milieux de cultures permettant d'effectuer facilement des recherches biochimiques sur le métabolisme microbien. Nous savons, en effet, que, dans ce cas, les milieux dits « synthétiques », obtenus à partir de composés chimiques bien déterminés, devront être avantageusement utilisés. Nous avons essayé, avant tout, de préparer des milieux aussi simples que possible, faciles à obtenir et permettant cependant une multiplication abondante et rapide des germes ensemencés. Comme les milieux synthétiques sont à ce point de vue nettement inférieurs aux milieux naturels, nous nous sommes adressés aux peptones pour apporter aux microbes les aliments azotés ou carbonés les plus difficiles à leur fournir qualitativement.

Nous avons donc préparé, par simple solution de différentes peptones dans l'eau distillée, des « eaux peptonées » que nous avons cherché à définir le plus exactement possible en utilisant un certain nombre de mesures physiques ou de dosages chimiques : mesure du pH, de la déviation polarimétrique, dosages de l'azote sous ses principales formes, du carbone, du phosphore, etc... Nous avons également essayé de simplifier les liquides de culture ainsi obtenus en les soumettant à la dialyse, afin d'en éliminer la presque totalité des sels minéraux solubles.

La valeur bactériologique des milieux ainsi préparés a été déterminée en ensemencant chacun d'eux avec une quantité connue de bacilles pyocyaniques prélevés dans des conditions identiques et en suivant la multiplication microbienne, non

pas en appréciant simplement, comme l'ont fait un certain nombre d'auteurs, la plus ou moins grande opacité des liquides ensemencés, mais en dénombrant à des intervalles déterminés, d'une part le nombre des microbes visibles, d'autre part le nombre des microbes capables de se reproduire sur milieux gélosés présents dans l'unité de volume de la culture. Les courbes représentatives de la croissance bactérienne, obtenues en partant de ces résultats, permettent de déterminer les qualités bactériologiques des milieux étudiés. De plus, en comparant la composition d'un milieu ensemencé et débarrassé des corps microbiens à celle du milieu initial, nous avons pu mettre en évidence les principaux changements apportés à la constitution des liquides de culture par la multiplication microbienne.

Enfin, constatant qu'il existait parfois des différences assez grandes entre la valeur bactériologique d'une peptone normale et la valeur bactériologique de la même peptone dialysée, nous avons essayé d'améliorer les solutions dialysées en les complétant par addition de composés déterminés : glucose ou mélange salin. Ces derniers essais nous ont donné des résultats intéressants que nous avons pu comparer à ceux qui avaient été signalés à diverses reprises par les auteurs américains.

Le travail ainsi poursuivi nous a permis d'établir les résultats suivants :

Dans le premier chapitre, les examens physiques et chimiques, effectués par nous sur différentes peptones, peptones préparées dans l'industrie ou au laboratoire, nous ont permis de retrouver, ou de préciser, les résultats déjà publiés par différents auteurs :

Les solutions de peptones pancréatiques possèdent, en général, une tension superficielle plus élevée que les solutions de peptones pepsiques. Par contre le pouvoir rotatoire des peptones pancréatiques est inférieur à celui des peptones pepsiques correspondantes.

Les peptones pancréatiques se différencient en général facilement des peptones pepsiques par l'essai à la tyrosinase, la

réaction à l'eau de brôme et la formation de cristaux de leucine et de tyrosine. Ces réactions ne sont cependant pas d'une rigueur absolue. La peptone pancréatique de gélatine fournit des résultats négatifs, qui la rapprochent des peptones pepsiques, car elle ne renferme ni tyrosine, ni tryptophane et la peptone pepsique de caséine renferme de la tyrosine libre.

Les peptones pancréatiques sont toujours beaucoup plus riches en azote aminé que les peptones pepsiques correspondantes. Si l'on excepte la peptone pancréatique de gélatine, dont la teneur en azote aminé est exceptionnellement faible, nous constatons que, conformément aux observations de M. JAVILLIER et B. GUÉRITHAULT, le rapport:

Az. titrable au formol

Az. total

est toujours supérieur à 20 pour les peptones pancréatiques et qu'il est, en général, inférieur à ce nombre pour les peptones pepsiques.

Les peptones pancréatiques paraissent plus riches en phosphore que les peptones pepsiques de même origine. Les peptones de caséine sont particulièrement riches en cet élément. Enfin, la proportion de chlorure de sodium contenue dans les diverses peptones est essentiellement variable.

Un certain nombre de peptones ont été soumises à la dialyse pour essayer d'en éliminer la plus grande partie des composés minéraux solubles. Les résultats obtenus varient largement suivant les peptones traitées et l'élimination, souvent incomplète, des éléments minéraux est presque toujours accompagnée d'une perte importante en azote aminé et en azote ammoniacal, en azote total et en carbone.

Dans le deuxième chapitre, nous nous sommes appuyé, pour comparer la valeur bactériologique des peptones étudiées, non seulement sur les nombres maxima des germes obtenus, mais aussi sur les caractéristiques de la croissance microbienne. C'est ainsi que nous avons défini chacune des phases de la croissance microbienne (phase de latence, phase de multiplication logarithmique, phase de multiplication ralentie), à la fois par sa durée et par la valeur des temps de génération qui

la caractérisent. Nous avons utilisé pour cela deux techniques de numération des germes : l'une donnant la totalité des microbes visibles, l'autre indiquant seulement le nombre de bactéries capables de se reproduire sur milieu solidifié par la gélose, et dénommées par nous « microbes résistants ».

Les résultats ainsi obtenus nous ont montré que la multiplication du bacille pyocyanique s'effectue dans toutes nos solutions de peptones suivant le même rythme général.

La multiplication des bacilles visibles commence aussitôt après l'ensemencement. Le nombre des germes formés augmente d'abord rapidement, puis de plus en plus lentement, passe par un maximum entre la 23^e et la 48^e heure de la culture, puis diminue peu à peu. La multiplication des germes capables de se reproduire sur gélose, au contraire, ne se déclare qu'un certain temps après l'ensemencement. Pendant cette phase de latence, qui peut atteindre deux ou trois heures, le nombre de ces germes « résistants » reste sensiblement stationnaire. La multiplication s'effectue ensuite très rapidement et nous entrons dans la phase de multiplication logarithmique dont la durée ne dépasse pas quelques heures. La division cellulaire se ralentit ensuite peu à peu, le nombre des bacilles capables de se reproduire sur gélose passe par un maximum vers la 22^e ou la 48^e heure de la culture, puis commence à décroître.

Nous voyons donc que, lorsqu'on suit la croissance microbienne en procédant simplement à la numération microscopique des bactéries visibles, la phase de latence n'existe pas. La multiplication microbienne commence aussitôt après l'ensemencement, mais cette multiplication ne donne d'abord naissance qu'à des germes fragiles, susceptibles de se reproduire dans le milieu liquide où ils ont pris naissance, mais incapables de supporter un changement de milieu et de se reproduire sur un milieu solide différent du liquide de culture originel. Ces remarques confirment les travaux de J. RÉGNIER, R. DAVID et A. KAPLAN, et rendent inutiles les différentes hypothèses émises pour expliquer l'existence de la phase de latence.

La valeur bactériologique des différentes peptones ordinaires étudiées par nous, peptones commerciales ou peptones préparées au laboratoire, semble, *dans le cas du bacille pyocyanique*, dépendre beaucoup plus de la matière première utilisée pour leur préparation que du ferment employé : pepsine ou pancréatine.

Les peptones de viande (peptones pancréatiques ou peptones pepsiques), la peptone de muqueuse permettent une excellente multiplication du bacille pyocyanique.

Les peptones de caséine donnent également de bons résultats mais, avec certains échantillons, la multiplication bactérienne relativement lente se prolonge jusqu'à la 50^e heure.

La peptone de fibrine permet d'obtenir un nombre très élevé de germes, mais ce maximum ne se produit que très tardivement, vers la 74^e heure, et à la suite d'une multiplication complexe se décomposant en deux phases successives.

La peptone de gélatine donne des résultats nettement inférieurs.

Dans chacun des groupes ainsi déterminés, il est difficile d'établir une différence importante entre la valeur bactériologique des peptones pepsiques et celle des peptones pancréatiques. Il semble pourtant que les peptones pancréatiques favorisent la multiplication des bacilles visibles et que les peptones pepsiques permettent une survie plus importante des germes dits « résistants ».

Après avoir soumis à la dialyse un certain nombre de ces peptones : peptone pancréatique de viande n° 1, peptone pepsique de viande n° 6, peptone pancréatique de caséine n° 5, peptone pepsique de caséine n° 10 et peptone pepsique de muqueuse n° 9, nous avons comparé la multiplication du bacille pyocyanique dans les solutions ainsi simplifiées et dans les solutions des peptones ordinaires correspondantes.

Si l'on excepte la peptone de muqueuse, dont la valeur bactériologique a été nettement abaissée par la dialyse, on n'observe pas entre la multiplication du bacille pyocyanique en eaux peptonées ordinaires et en eaux peptonées dialysées, de différences aussi grandes qu'on aurait pu le supposer. Les seules variations observées sont les suivantes :

a) la multiplication des bacilles visibles pendant les deux ou trois premières heures de la culture semble plus rapide dans les eaux peptonées ordinaires que dans les eaux peptonées correspondantes dialysées ;

b) la multiplication des bacilles capables de se reproduire sur gélose est un peu plus rapide, pendant la phase de multiplication logarithmique, avec les eaux peptonées ordinaires ;

c) tandis qu'avec les peptones ordinaires, le maximum des germes visibles n'est obtenu, assez fréquemment, qu'une dizaine d'heures après celui des germes « résistants », avec les peptones dialysées ces deux maxima se produisent toujours en même temps ;

d) si les maxima des germes formés sont, en général, plus élevés dans le cas des peptones ordinaires que dans celui des peptones dialysées, les différences observées sont souvent assez faibles et il arrive même que des peptones dialysées fournissent des chiffres plus élevés que les peptones simples correspondantes.

Enfin en comparant la composition des eaux peptonées dialysées stériles à celle des mêmes milieux ensemencés puis débarrassés des corps microbiens à la 48^e heure de la culture, nous avons constaté que la multiplication du bacille pyocyanique provoque dans la constitution des liquides de culture, les modifications suivantes :

1° Les cultures s'alcalinisent légèrement et leur pH atteint environ 7,8 ;

2° La déviation polarimétrique diminue, tout au moins dans les cas où la lecture a été possible ;

3° La tension superficielle augmente très légèrement ;

4° L'azote total et le carbone total diminuent nettement. Le

rapport $\frac{\text{C disparu}}{\text{Az. disparu}}$ étant compris entre 2,3 et 6,6.

5° L'azote ammoniacal augmente et l'azote aminé décroît

sans que les diminutions observées soient en rapport avec le nombre des germes formés ;

6° Le phosphore total diminue nettement. Les variations observées croissent avec la richesse en phosphore du milieu initial ;

7° Dans la majorité des cas la teneur en chlorures des milieuxensemencés et filtrés ne diffère pas sensiblement de celle des milieux originaux.

Dans le troisième chapitre, nous avons cherché à augmenter la valeur bactériologique des solutions dialysées en les additionnant de composés chimiquement définis. Les travaux de différents auteurs ayant mis en évidence l'influence exercée par le glucose ou par certains éléments minéraux sur la croissance microbienne, nous avons ajouté à l'eau peptonée dialysée n° 6 (peptone pepsique de viande), soit 2 % de glucose, soit une solution saline renfermant du chlorure de sodium, du chlorure de potassium, du nucléinate de sodium et du sulfate de magnésium, soit à la fois du glucose et ce mélange salin. La comparaison des essais effectués en cultivant le bacille pyocyanique dans les milieux ainsi obtenus nous a conduit aux conclusions suivantes :

a) L'eau peptonée dialysée donne des résultats inférieurs à ceux qui sont obtenus avec l'eau peptonée ordinaire ;

b) L'eau peptonée dialysée additionnée soit de glucose, soit de mélange salin, soit de l'ensemble de ces composés, donne des résultats parfois égaux, presque toujours très nettement supérieurs à ceux qui sont observés avec l'eau peptonée ordinaire. L'eau peptonée dialysée ainsi « améliorée » possède donc une valeur bactériologique égale ou supérieure à celle de l'eau peptonée simple. Le nombre des germes formés ne semble pourtant pas pouvoir dépasser une certaine limite et l'eau peptonée dialysée glucosée et minéralisée ne donne pas de meilleurs résultats que l'eau peptonée dialysée simplement minéralisée.

La multiplication du bacille pyocyanique provoque dans

ces milieux des modifications chimiques analogues à celles que nous avons déjà observées au chapitre précédent. La présence du glucose empêche simplement l'alcalinisation des liquides de culture et diminue la quantité d'azote ammoniacal produit. Cependant si nous tenons compte en même temps du nombre de germes formés et si nous calculons les modifications chimiques provoquées par la formation de un milliard de germes par exemple, nous obtenons des valeurs fort différentes suivant la composition des liquidesensemencés :

a) la quantité d'azote total disparu est beaucoup plus grande dans le cas des bacilles visibles, avec l'eau peptonée simple et avec l'eau peptonée dialysée, qu'avec les eaux peptonées « améliorées » ;

b) l'azote ammoniacal formé est beaucoup plus abondant dans le cas de l'eau peptonée simple que dans celui des autres milieux. L'addition de glucose diminue encore cette formation ;

c) l'azote aminé consommé est surtout important avec l'eau peptonée ordinaire. La présence du glucose semble sans influence sur l'utilisation de l'azote aminé ;

d) le carbone total diminue principalement dans l'eau peptonée simple et dans les solutions glucosées. L'addition de glucose diminue parfois d'une façon importante la quantité de carbone emprunté aux peptones ;

e) les quantités de phosphore total enlevées aux liquides de culture sont d'autant plus grandes que les milieux stériles sont plus riches en cet élément.

Suivant la nature et la quantité des aliments offerts, il semble donc que le bacille s'adapte au milieu dans lequel il se multiplie et il est vraisemblable que la constitution de la cellule bactérienne sera modifiée en conséquence.

D'après nos résultats, il nous semble qu'un milieu de culture ayant la composition suivante :

Peptone de viande pepsique n° 6 dialysée .	10 gr.
Glucose	20 gr.
Sulfate de magnésium cristallisé	1 gr.
Nucléinate de sodium	1 gr.
Chlorure de sodium	5 gr.
Chlorure de potassium	1 gr.
Eau distillée q. s. p.	1.000 cc.

pourra donner avec le bacille pyocyanique une multiplication microbienne satisfaisante.

Vu :
LE DOYEN,
P. GUÉRIN

Vu :
LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,
M. RADAIS

Vu et permis d'imprimer :
LE RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

1. ARNAUD (A.) et CHARRIN (A.). — Recherches chimiques sur les sécrétions microbiennes, transformation et élimination de la matière organique azotée par le bacille pyocyanique dans un milieu de culture déterminé. *C. R. Ac. Sc.*, 1891, **112**, p. 755.
2. AUBEL (E.). — Recherches biochimiques sur la nutrition du bacille pyocyanique. Imprimerie E. Lannier, Caen, 1921.
3. BARBER. — The rate of multiplication of bacillus coli at different temperatures. *Journ. of inf. Diseases*, 1908, **5**, p. 379.
4. BERMAN et RETTGER. — Bacterial nutrition : Further studies on the utilization of protein and non protein nitrogen. *Journ. of Bact.*, 1918, **3**, p. 367 et **4**, p. 389.
5. BERTHELOT (A.), RAMON (G.) et Mlle AMOUREUX. — Recherches biochimiques sur les toxines et leurs dérivés. Etude des facteurs qui influencent l'élaboration de la toxine tétanique et sa transformation spontanée en anatoxine. *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1927, **41**, p. 83.
6. BLAGOWESTSCHENSKI. — Über den Einfluss hoher Konzentrationen neutraler Stoffe auf die Wirkung der Peptase. *Biochem. Zeits.*, 1926, **168**, p. 6.
7. BRAUN et GOLDSCHMIDT. — Die Bedeutung der mineralen für den Stoffwechsel der bakterien der typhus Coli-Gruppe. *CentralBlatt für Bakt*, 1927, **40**, p. 838.
8. BUCHANAN (R.-E.). — Life phases in bacterial cultures. *Journ. of inf. Diseases*, 1918, **23**, p. 109.
9. BUCHANAN (R.-E.). — Growth curves of bacteria. In the Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology de Jordan (E. O.) et Falk (I. S.), chapitre V, p. 46.
10. BUCHANAN (R.-E.) et FULMER (E.-J.). — Growth phases and growth rates in cultures of microorganisms, in *Physiology and Biochemistry of Bacteria*, chapitre II, p. 4.

11. BUCHNER (H.), LONGARD (K.) et RIEDLIN (G.). — Über die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1887, **2**, p. 1-6.
12. CHATRON (M.). — Etude de deux microméthodes de dosage de l'ion SO_4 . Application au dosage du soufre sanguin. *Th. Doct. Pharmacie*, Girault, St-Cloud, 1930.
13. LANE CLAYPON (Janet E.). — Multiplication of bacteria and the influence of temperature and some other conditions. *Journ. of hygiene*, 1909, **9**, p. 239.
14. COPAUX (H.). — Procédé rapide pour doser l'acide phosphorique. *C. R. Ac. Sc.*, 1921, **173**, p. 656.
15. DAVID (R.). — Contribution à l'étude numérique de la multiplication du bacille pyocyanique dans différents milieux de culture liquides. *Thèse Doct. ès-sciences*, Paris 1931. Durand Ed. à Chartres.
16. DUTHOIT (A.). — Action sur différents microbes du chlorure de sodium à divers taux de concentration. *C. R. So. Biol.*, 1923, **89**, p. 550.
17. FLEURY (M.-P.) et ZAHARIE SUTU. — Le phosphore organique urinaire. Son dosage. Quelques résultats. *J. P. C.*, 1926, **11**, p. 431.
18. FRIES. — Eine einfache Methode zur genauen Bestimmung der Bakterienmengen in Bakterien suspensionen. *Centralblatt für Bakt.*, Originale, 1921, **86**, p. 90.
19. GESSARD (C.). — Diagnose pigmentaire du bacille pyocyanique. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1919, **33**, p. 241.
20. GLINKA TSCHERNORUTSKÝ (H.). — Über den Stickstoffumsatz bei *Bac. mycoïdes*. Die Beeinflussung des Stickstoffumsatzes bei *Bac. mycoïdes* durch Kohlenhydrate, mehrwertige Alkohole und Glucoside. *Bioch. Zeits.*, 1930, **226**, p. 62.
21. GLINKA TSCHERNORUTSKÝ (H.). — Beeinflussung der Stickstoffumsatz bei *Bac. mycoïdes* durch Glucose in verschiedener Konzentration. *Bioch. Zeits.*, 1930, **221**, p. 113.
22. GLINKA TSCHERNORUTSKÝ (H.). — Über den Stickstoffumsatz bei *Bac. mycoïdes* VI. Über Ausnutzung verschiedener Stickstoffquellen durch den *Bac. mycoïdes*. *Bioch. Zeits.*, 1933, **263**, p. 144.
23. GORIS (A.) et LIOT (A.). — Observations sur la culture du bacille pyocyanique sur milieux artificiels définis. *C. R. Ac. Sc.*, 1921, **172**, p. 1.622.

24. GUILLEMIN (M.) et LARSON (M.-P.) — The relation between the fixed and free salts of bacteria. *Journ. of inf Diseases*, 1922, **31**, p. 349.
25. HARLAY. — De l'application de la tyrosinase à l'étude des ferments protéolytiques. *Thèse doctorat en pharmacie*, Paris, 1900.
26. HEHEWERTH (F.-H.). — Die mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien von Alex. Klein und einige Anwendungen derselben. *Archiv. für hygiène*, 1901, **39**, p. 321.
27. HINGLAIS (H.). — Dosage du chlore et du soufre dans les végétaux. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1926, **33**, p. 625.
28. HINGLAIS (Mme H.). — Sur l'application de la méthode de M. Copaux au dosage de petites quantités de phosphore dans les tissus. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, p. 540.
29. HINGLAIS (Mme H.). — Contribution à l'étude de la répartition du phosphore dans les organes des vertébrés. *Th. Doc. ès-sc.*, Lons-le-Saunier, Declume, 1928.
30. JAVILLIER (M.). — Les ferments protéolytiques. Etude chimique et pharmaco-technique. Thèse d'agrégation, Paris, 1909, Vigot frères.
31. JAVILLIER (M.) et GUERITHAULT (B.). — Sur la distinction des peptones médicinales d'origine pepsique et d'origine pancréatique. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1910, **17**, p. 63.
32. JONES, HORRY (M.). — The protein-sparing action of utilisable carbohydrates in cultures of certain sugar-fermenting organisms. *J. Inf. Diseases*, 1916, **19**, p. 33.
33. KAPLAN BRILLE (Mme A.). — Influence du nombre des microbesensemencés sur la multiplication du bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide. *Thèse Doctorat en pharmacie*, Paris 1931, Vieillemand, 16, rue de la Glacière.
34. KENDALL et FARMER. — Studies in Bactérial Metabolism. *Journ. Biol. Chem.*, 1912, **12**, p. 13, 215, 465; 1912, **13**, p. 63.
35. LIOT (A.). — Culture du bacille pyocyanique sur milieux chimiquement définis. *Th. Dipl. Pharm. Sup.*, Imprimerie de la cour d'appel, Paris, 1923.
36. LEMOIGNE (M.), DOPTER (P.) et DESNEAUX (R.). — Sur le bilan de l'azote titrable à la méthode de Kjeldahl dans les cultures microbiennes aérobies. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1934, **16**, p. 18.

37. MEILLÈRE (G.) et DE SAINT-RAT. — Dosage de l'azote total. Disposition pour recueillir l'ammoniaque. Application au dosage des albumines du lait. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1922, **25**, p. 100.
38. MESTREZAT (W.). — Formol-titration des acides aminés en solution aqueuse ou dans l'urine. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1919, **1**, p. 107.
39. MESTREZAT (W.). — Note de laboratoire sur l'emploi de quelques indicateurs colorés. L'alizarine-sulfonate de soude sensibilisée. *Journ. Pharm. et Chim.* 1920, **21**, p. 185.
40. MESTREZAT (W.) et JANET (Mlle M.-P.). — Présence dans l'urine d'un reste azoté que ne dose pas la méthode de Kjeldahl. Etude comparée des résultats fournis dans quelques cas par la technique de Kjeldahl-Førster et la méthode de Dumas. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1921, **3**, p. 88.
41. MESTREZAT (W.) et JANET (Mlle M.-P.). — L'azote titrable par la méthode de Kjeldahl. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1921, **3**, p. 105.
42. MESTREZAT (W.) et JANET (Mlle M.-P.). — Dosage de l'ammoniaque urinaire par le procédé à la cloche de Schloesing. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1922, **4**, p. 154.
43. MESTREZAT (W.) et JANET (Mlle M.-P.). — La formation du nitrile gluco-heptonique dans les urines sucrées cyanurées, cause d'erreur pour le dosage de l'ammoniaque. Valeur de la méthode de Schaffer au carbonate de soude. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1923, **5**, p. 464.
44. MESTREZAT (W.). — L'azote urinaire non titrable par la méthode de Kjeldahl. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, **8**, p. 341.
45. MOLLIEUX (P.). — Recherches biochimiques sur la nutrition azotée du bacillus fœcalis alcaligènes. *Thèse Doct. Université. Le François, Paris*, 1932.
46. NICLOUX (M.). — Microdosage du carbone. Application à la détermination du carbone urinaire. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, **9**, p. 639.
47. PENFOLD (W.-J.). — On the nature of bacterial lag. *Journ. of Hygiène*, 1914, **14**, p. 215.
48. PETIT (J.). — Sur les peptones. *J. P. C.*, 1881, **3**, p. 529.
49. RAHN (Otto). — Über den Einfluss der Stoffwechselprodukte auf das Wachstum der Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 11 Abt., 1906, **16**, p. 417 et 609.

50. RÉGNIER (J.) et LAMBIN (S.). — Introduction à l'étude des antiseptiques. Etude numérique du croît d'un bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1927, **34**, p. 401 et 490.
51. RÉGNIER (J.) et LAMBIN (S.). — Contribution à l'étude des méthodes de numération des microbes. Dénombrement des colonies développées sur milieux nutritifs solidifiés. *B. S. P.* 1934, **41**, p. 7.
52. RÉGNIER (J.) et LAMBIN (S.). — Contributions à l'étude des méthodes de numération des microbes. Dénombrement des colonies développées sur milieux nutritifs solidifiés. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1934, **41**, p. 78.
53. RÉGNIER (J.) et NEIPP (L.). — Contribution à l'étude des méthodes de numération des microbes. Numération de la totalité des microbes visibles. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1934, **41**, p. 152.
54. RÉGNIER (J.) et NEIPP (L.). — Contribution à l'étude des méthodes de numération des microbes. Numération de la totalité des microbes visibles. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1934, **41**, p. 231.
55. RÉGNIER (J.) et NEIPP (L.). — Contribution à l'étude des méthodes de numération des microbes. Numération de la totalité des microbes visibles. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1934, **41**, p. 291.
56. SLANETZ et RETTGER. — Bacterial Metabolism. The influence of phosphate buffer in carbohydrate free and in glucose containing media. *J. of Bact.*, 1928, **15**, p. 297.
57. SMITH (Graham). — The behaviour of bacteria in fluid cultures as indicated by daily estimates of the numbers of living organisms. *Jour. of Hygiène*, 1920, **19**, p. 155.
58. STEPHENSON (M.). — Bacterial Metabolism. London, Green and C^o, 1930.
59. SUPNIEWSKI (J.). — Recherches sur la transformation des combinaisons carbonées par les bacilles pyocyaniques. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, p. 1.377.
60. TORBET et BRODLAY (H.-C.). — Studies of peptic activity. The liberation of arginine and tyrosine complexes in peptic proteolysis. *Journ. Biol. chim.*, 1931, **92**, p. 27.
61. WAKSMANN et LOMANITZ. — Contribution to the chemistry of decomposition of proteins and amino-acids by various groups of micro organisms. *J. of agricul. research*, 1925, **30**, p. 263.

62. WILSON (G.-S.). — The proportion of viable bacteria in young cultures with especial reference to the technique employed in counting. *Journ. of Bact.*, 1922, **7**, p. 405.
63. WINSLOW (C. E. A.). — The Rise and Fall of Bacteria Populations in the N. knowledge of bact. and im., de Jordan et Falk, chap VI, p. 58.
64. WINSLOW (C. E. A.) et BROOKE (Olive R.). — The viability of various species of bacteria in aqueous suspensions. *Journ. of Bact.*, 1927, **13**, p. 235.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
------------------------	---

CHAPITRE I

LES PEPTONES. — EXAMENS PHYSIQUES ET CHIMIQUES, DOSAGES DES ÉLÉMENTS ESSENTIELS ET PURIFICATION	7
--	---

I. — Préparation, caractères et composition des différen- tes peptones	7
---	---

1° Peptones pepsiques	8
a) Peptones dites chlorhydropepsiques	8
b) Peptones dites pepsino-tartriques	8
c) Peptones sulfuriques	9
2° Peptones pancréatiques	9
3° Caractères et composition	9

II. — Peptones utilisées dans nos essais	12
--	----

1° Peptones pancréatiques	12
Peptone pancréatique n° 1	12
Peptone pancréatique n° 2	13
Peptone de gélatine n° 3	13
Peptone de caséine n° 4	13
Peptone de caséine n° 5	14
2° Peptones pepsiques	15
Peptone pepsique n° 6	15
Peptone pepsique n° 7	15
Peptone de fibrine n° 8	15
Peptone de muqueuse n° 9	15
Peptone de caséine n° 10	16

3° Déterminations physiques et chimiques effectuées dans nos essais. Préparation des solutions de peptones	17
---	----

III. — Méthodes utilisées pour définir les solutions de peptones employées	13
<i>Mesures physiques</i>	18
1° Mesure du pH	18
2° Tension superficielle	19
3° Déviation polarimétrique	19
<i>Examens chimiques qualitatifs</i>	19
1° Réaction de la tyrosinase	20
2° Formation de cristaux de leucine et de tyrosine.	20
3° Réaction à l'eau de brome	21
<i>Examens chimiques quantitatifs</i>	21
1° Dosage de l'azote sous ses principales formes	21
a) Azote total	21
b) Azote amino-ammoniacal	23
c) Azote ammoniacal	25
d) Azote aminé	26
2° Dosage du carbone	26
3° Dosage du phosphore total, du phosphore organique et du phosphore minéral	34
a) Dosage du phosphore total	34
b) Dosage du phosphore organique	38
c) Dosage du phosphore minéral	39
4° Dosage des chlorures	39
5° Dosage des sulfates	39
<i>Résultats obtenus dans l'examen des diverses peptones.</i>	40
Discussion des résultats	44
A) Mesures physiques	44
B) Examens chimiques qualitatifs	44
C) Examens chimiques quantitatifs	45
IV. — Dialyse des solutions de peptones	47
1° Résultats obtenus	49
2° Discussion des résultats	52
<i>Résumé du premier chapitre</i>	53

CHAPITRE II

DÉTERMINATION DE LA VALEUR BACTÉRIOLOGIQUE DES PEPTONES CHOISIES: PEPTONES ORDINAIRES ET PEPTONES DIALYSÉES	55
I. — Méthodes de numération utilisées pour suivre quanti- tativement la multiplication du bacille pyocyanique ..	56
1° Numération des microbes dits « résistants » par la méthode des plaques de gélose	58
<i>Principe</i>	58
<i>Technique</i>	58
A) Préparation du matériel nécessaire	58
a) Bouillon à l'extrait de viande Liebig gélosé à 30 0/00	58
b) Sérum physiologique à 8 0/00	59
c) Boîtes de Petri et pipettes graduées stérilisées	59
B) Dilution du milieu de culture primitif	59
C) Ensemencement sur bouillon gélosé et étalement en boîte de Petri	60
D) Numération des colonies développées	60
2° Numération des microbes visibles (« microbes vivants » et « microbes morts ») par la méthode de numération microscopique comparative	61
<i>Principe</i>	61
<i>Technique</i>	61
A) Préparation de l'émulsion de levure titrée	62
B) Numération des bactéries	62
II. — Données actuellement admises sur l'évolution du croît microbien	64
Phase de latence	65
Phase de multiplication logarithmique	65
Phase de multiplication ralentie	66
Phase de maximum stationnaire	66
Phase de destruction des bactéries	66
III. — Essais personnels	66
1° Microbe utilisé	67
2° Milieux employés	67

a) Peptones commerciales	68
b) Peptones préparées au Laboratoire	68
c) Peptones dialysées	69
3° Technique utilisée pour l'étude de la multiplication microbienne	69
4° Etude détaillée de la multiplication du bacille pyocyanique dans une solution de peptone pancréatique n° 1	70
a) Préparation et titrage de l'émulsion de levure	70
b) Préparation et numération de l'émulsion microbienne destinée à l'ensemencement	70
c) Ensemencement et mise à l'étuve	71
d) Prélèvements successifs	72
e) Résultats obtenus	72
5° Résultats obtenus dans l'étude des diverses peptones pures	78
Valeur bactériologique des diverses peptones	96
6° Culture du bacille pyocyanique en solutions de peptones dialysées	116
IV. — Modification de la composition des milieux de culture sous l'influence de la multiplication microbienne	138
A) Modifications provoquées par le métabolisme microbien	143
B) L'intensité de la multiplication microbienne est-elle en relation simple avec la constitution des milieux ?	145
<i>Résumé et conclusion du deuxième chapitre</i>	146

CHAPITRE III

INFLUENCE DE L'ADDITION DU GLUCOSE ET D'UN MÉLANGE DE SELS SUR LA MULTIPLICATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS UNE EAU PEPTONÉE A 10 % CHOISIE ET PRÉALABLEMENT DIALYSÉE	149
I. — Influence du glucose sur la nutrition microbienne	150
II. — Influence des éléments minéraux sur la croissance microbienne	152

III. — Mode opératoire utilisé dans nos recherches	153
<i>Milieux de culture</i>	153
1° Eau peptonée simple	153
2° Eau peptonée dialysée	154
3° Eau peptonée dialysée glucosée	154
4° Eau peptonée dialysée minéralisée	155
5° Eau peptonée dialysée glucosée minéralisée	156
<i>Ensemencement de la culture</i>	158
IV. — Multiplication du bacille pyocyanique dans l'eau peptonée simple, dans l'eau peptonée dialysée et dans l'eau peptonée dialysée additionnée de glucose ou de la constante saline ou du mélange glucose et constante saline.	158
V. — Modification de la composition des milieux de cul- ture sous l'influence de la multiplication du bacille pyo- cyanique	173
<i>Résumé et conclusion du troisième chapitre</i>	180
CONCLUSIONS	183
INDICATIONS BIBLIOGRAPHIQUES	193

III — 204
..... 205
..... 206
..... 207
..... 208
..... 209
..... 210
..... 211

VI — 212
..... 213
..... 214
..... 215
..... 216
..... 217
..... 218
..... 219



IMPRIMERIE SPÉCIALE
DE
MM. VIGOT Frères



